Riviane Garcez da Silva

Análise da estrutura genética populacional do
curimbatá (*Prochilodus lineatus*,
Characiformes: Prochilodontidae) na região da
bacia do Rio Grande, SP.

São Paulo

2006

Riviane Garcez da Silva

Análise da estrutura genética populacional do
curimbatá (*Prochilodus lineatus*,
Characiformes: Prochilodontidae) na região da
bacia do Rio Grande, SP.

São Paulo

2006

Riviane Garcez da Silva

Análise da estrutura genética populacional do curimbatá
(*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae)
na região da bacia do Rio Grande, SP.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientador(a): Lurdes Foresti de
Almeida Toledo

São Paulo

2006

Silva, Riviane Garcez
Análise da estrutura genética populacional
do curimbatá (*Prochilodus lineatus*,
Characiformes: Prochilodontidae) na região
da bacia do Rio Grande, SP.
100 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Estrutura populacional 2.
Prochilodus lineatus 3. Manejo pesqueiro

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais.
Sem vocês isto não seria possível.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Fapesp, pelo apoio concedido com a bolsa de mestrado.

Agradeço à Fapesp e ao CNPq pelo apoio dado ao Laboratório de Ictiogenética do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IB-USP-SP, no qual este trabalho foi realizado.

Agradeço especialmente à Profa. Lurdes Foresti de Almeida Toledo, pelo apoio em todos os momentos da minha carreira e da minha vida, pela amizade e pela confiança em mim.

Agradeço à Cinthia Moysés pela leitura e correções dedicadas a este trabalho. Agradeço ao George Mattox pela ajuda na redação final.

Agradeço também às minhas grandes amigas de laboratório, Flora Fernandes, Soraia Fonteles, Cinthia Moysés (novamente), Sabrina Baroni, Maria de Fátima Daniel e Daniela Calcagnotto, pela ajuda nos bons e maus momentos, pelas risadas no laboratório, nos bares e nos congressos.

Agradeço ao Carlos Lopes, ao Rodrigo Toledo, ao Ricardo Shuhei, à Mirian, à Vânia, ao Felipe, ao Fred e à Marta, amigos que estão ou passaram pelo laboratório.

Agradeço a todos os pescadores e comerciantes que me ajudaram nas coletas.

Agradeço aos amigos de todas as horas: George Mattox (meu peixeiro favorito), Rodrigo Garcez (irmão super querido), Beatriz Camargo (amiga de todas as horas, mesmo), Adriano Alonso e Fábio Pinheiro (por compartilharem as angústias do mestrado), Pedro Nunes e Fernanda Hussein (pelas baladas essenciais).

Agradeço especialmente ao Tiago Gil pelo apoio tático operacional nas coletas e durante o mestrado inteiro. Definitivamente, sem você este trabalho teria sido muito mais difícil e meu coração mais vazio.

Agradeço à minha família querida, que me tornou quem sou. Obrigado.

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
1. Introdução	1
1.1 Impactos da presença de barragens sobre a fauna de peixes	2
1.2 Histórico das barragens na área estudada	5
1.3 O caso do curimatá (<i>Prochilodus lineatus</i>) na bacia do Rio Grande	8
1.3.1 Características da espécie <i>P. lineatus</i>	10
1.4 Importância da conservação e formas de manejo dos recursos pesqueiros continentais	11
1.4.1 Manejo das populações de peixes	13
1.4.2 Manejo do ambiente aquático	15
1.4.3 Manejo da pesca	15
1.5 O uso de PCR-RFLP (<i>Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>) em estudos populacionais de peixes	16
2. Objetivos	19
3. Materiais e métodos	20
3.1 Materiais	20
3.2 Métodos	22
3.1. Análise dos resultados	24
4. Resultados	27
4.1 Padrões de restrição do fragmento ND2-CO1 do mtDNA	27
4.2 Padrões de restrição da região controle (<i>D-loop</i>) do mtDNA	31
5. Discussão	70
5.1 Padrões de restrição do fragmento ND2-CO1 do mtDNA	70
5.2 Padrões de restrição da região controle (<i>D-loop</i>) do mtDNA	71
6. Conclusões	82
7. Referências Bibliográficas	84
8. Anexos	91

Resumo

O curimatá (*Prochilodus lineatus*) é uma espécie de importância comercial na pesca continental brasileira, especialmente na região da bacia do Rio Grande. Diversos estudos foram realizados com o curimatá nesta região, incluindo os de delimitação populacional. Desde então, a região passou por alterações ambientais causadas pela construção de diversas barragens, impossibilitando migrações a montante, essenciais para a reprodução de *P. lineatus*. O presente estudo teve como objetivo verificar o impacto das barragens, sob o ponto de vista genético, na população de curimatá da bacia do Rio Grande. Para tanto, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP do fragmento entre os genes ND2 e CO1 e também da região controle, ambos do mtDNA, com 10 e 15 enzimas de restrição, respectivamente. Foram realizadas coletas em nove localidades entre barragens que não possuíam escadas para a migração de peixes. As localidades são: no Rio Grande - Cardoso, Colômbia, Conceição das Alagoas, Igarapava, Pedregulho e São João Batista do Glória; no Rio Mogi-Guaçu - Pirassununga e Espírito Santo do Pinhal; e no Rio Pardo - Jaborandi. Os resultados obtidos na análise do fragmento ND2-CO1 com três amostras, sendo uma de cada rio, não evidenciaram divergência significativa. Os índices de diversidade genética (haplotípica e nucleotídica) observados foram baixos, quando comparados com outras espécies de peixes. Estes resultados são condizentes com o esperado para seqüências conservadas, por isso, optou-se pela análise de uma região mais variável, como a região controle do mtDNA. Os resultados obtidos para a região controle (*F_{st}*, distribuição de Monte Carlo, teste exato e AMOVA) evidenciaram divergência significativa entre a amostra de Jaborandi e as demais, este fato pode ser devido a uma sub-estruturação populacional, ou a um erro de identificação da localidade de coleta. As outras amostras evidenciaram que, em geral, fazem parte de uma única população sob o ponto de vista genético. Não foi observada estruturação por distância, já que não houve correlação entre a distância genética e a distância geográfica. Os índices de diversidade (nucleotídica e haplotípica) são considerados de altos a moderados, sendo que os maiores foram obtidos para as amostras localizadas em trechos onde ainda há características naturais da bacia. A presença de poucos haplótipos amplamente distribuídos e internos na rede de haplótipos e de diversos haplótipos raros localizados periféricamente na rede, são um indício de expansão populacional recente. A expansão foi averiguada, também, com testes de

neutralidade e gráficos de distribuição *mismatch*. O tempo de expansão foi calculado em 238 mil anos, que corresponde ao Pleistoceno Médio, época de grandes mudanças climáticas na América do Sul. Em conclusão, as alterações ambientais provocadas pelas barragens não geraram, a curto prazo, diferenças significativas entre as amostras estudadas, assim como parecem não estar diminuindo a variabilidade genética do curimatã, quando comparada com a de populações naturais de outros rios. A divergência obtida para Jaborandi deve ser melhor estudada, mas parece refletir ausência de fluxo anterior à construção das barragens. O objetivo pretendido é o de apresentar um parâmetro de comparação para estudos futuros, especialmente aqueles que enfoquem o monitoramento da variabilidade genética do curimatã. Estudos de longo prazo devem ser realizados no intuito de auxiliar o manejo pesqueiro do curimatã, inclusive em programas de repovoamento.

Abstract

Prochilodus lineatus has a commercial importance in the Brazilian freshwater fishing, especially in the Rio Grande basin. Several studies have been done with *P. lineatus* in this area, including those delimiting populations. Since then, the Rio Grande basin has been changed due to environmental impacts caused by construction of several dams. The most expressive impact for this population of *P. lineatus* was the impossibility of upstream migration, essential for its reproduction. The present study aimed at genetically verifying the impact of dams in the population of *P. lineatus* from Rio Grande basin. The PCR-RFLP method was used in mitochondrial DNA fragments ND2-CO1 and control region, with 10 and 15 restriction enzymes, respectively. Nine samples collected between dams with no fish ladders were analyzed: in Rio Grande - Cardoso, Colômbia, Conceição das Alagoas, Igarapava, Pedregulho e São João Batista do Glória; in Rio Mogi-Guaçu - Pirassununga e Espírito Santo do Pinhal; and in Rio Pardo – Jaborandi. Analysis results of the ND2-CO1 fragment with three samples, one from each river, did not show significant divergence. Values of haplotype and nucleotide diversity were low when compared to other fish species. These results are expected for conserved sequences, so analysis of a more variable region, such as the control region, was chosen. Results of the control region (*Fst*, Monte Carlo distribution, exact test and AMOVA) showed a significant divergence between Jaborandi sample and the others. This could be due to a population structure, or to an error in the locality identification. The other samples seem to be part of a single population. Isolation by distance was not verified since there is no correlation between genetic and geographic distances. Values of haplotype and nucleotide diversity ranged from high to moderate, with the highest values found in samples from localities where natural features of the basin still exist. Presence of few and widely distributed haplotypes internally in the haplotype net, and the occurrence of several other rare haplotypes distributed peripherically in the haplotype net, are typical of a recent population expansion. The expansion was also verified in neutrality tests and mismatch distribution. The calculated expansion time is 238 thousands of years that correspond to the Median Pleistocene, a period of great climatic changes in South America. In conclusion, the environmental changes caused by dams did not generate significant differences among the analyzed samples, in a short-term, and did not seem to be decreasing the genetic variability of *P.*

lineatus, when compared to other natural populations. Divergence obtained for Jaborandi should be better studied, but seems to reflect the absence of gene flow prior to the construction of dams. These work intends to present a comparative parameter for future studies, especially those monitoring the genetic variability of *P. lineatus*. Long-term studies must be conducted to help fisheries management of *P. lineatus*, including restock programs.

1. Introdução

Nas últimas décadas, a região sudeste do Brasil apresentou um forte crescimento populacional e industrial. Para suprir a demanda energética decorrente desse crescimento, foram construídas diversas usinas hidrelétricas, cujas barragens impedem o fluxo natural da água dos rios.

A construção de uma represa (ou barragem) em um curso d'água ocasiona normalmente a formação de um reservatório. A maioria dos reservatórios no Brasil possui uma forma dendrítica, gerando uma complexidade de ambientes, já que o tempo de retenção da água (tempo que uma determinada massa d'água permanece no reservatório) nos seus vários compartimentos pode ser bem maior do que no canal central (Tundisi *et al.*, 1993). O canal central de um reservatório normalmente segue o curso original do rio, e apresenta maior profundidade em relação aos outros compartimentos do reservatório, porém, apresenta, também, uma maior deposição inicial de sedimentos (Thornton, 1980).

O maior problema resultante da construção de um reservatório para a vida aquática é a transformação de um ambiente lótico (água corrente) em lêntico (água parada), gerando alterações físicas e químicas da água (como, por exemplo, aumento da transparência), variação térmica ao longo do perfil e perda de nutrientes rio abaixo, devido à sedimentação, que está associada à diminuição da velocidade do curso d' água. (Müller, 1995).

A construção de um reservatório gera impactos sobre a fauna e a flora, que incluem: desaparecimento de vegetação terrestre e das matas ciliares, que constituem importantes sistemas de manutenção da diversidade; desaparecimento da fauna terrestre; alterações da fauna de peixes; e aumento da biomassa de macrófitas aquáticas (Tundisi, 1987).

Uma das conseqüências imediatas destas construções é o desaparecimento, pela elevação do nível de água, das inúmeras lagoas marginais nos sistemas de várzeas com baixa declividade e meandros. As lagoas marginais funcionam como capacitores de biomassa para os rios (Tundisi, 1987).

Além dos impactos ambientais resultantes da construção de um único reservatório, é importante avaliar também os efeitos cumulativos das barragens sobre um sistema fluvial. No Estado de São Paulo, por exemplo, são encontrados diversos reservatórios em cascata nas bacias dos rios Grande, Paraná e Tietê. O único trabalho

encontrado sobre os efeitos cumulativos das barragens nessa região foi realizado por Barbosa *et al.* (1999) na bacia do Tietê.

O trabalho dos autores acima citados utiliza o conceito de rio contínuo (do inglês *River Continuum Concept*), que propõe que o gradiente de fatores físicos, formados pela bacia de drenagem, exerce um controle direto sobre as estratégias biológicas e sobre a dinâmica do sistema hídrico (Petts, 1984).

O gradiente de fatores físicos de um sistema hidrológico inclui diversos parâmetros. Por exemplo: examinando-se um curso d'água no sentido da cabeceira para a foz (da montante para a jusante ou do planalto para a planície), há valores crescentes de temperatura da água, substâncias orgânicas, condutividade, material em suspensão, nutrientes, profundidades e vazão, e valores decrescentes de saturação de oxigênio, declividade, erosão, transparência e granulometria do leito. Assim, não é aconselhável tratar um rio como uma entidade única, mas como uma composição de ambientes com condições ecológicas diferenciadas (Martins, 2000).

Sendo assim, conforme aumenta o número de barragens em uma determinada bacia hidrográfica, aumentam, também, a fragmentação do ecossistema fluvial e os impactos sobre o mesmo, especialmente sobre os regimes de fluxo, sobre o transporte de sedimentos, integridade do habitat, composição e abundância de espécies (Girard, 2002).

1.2 Impactos da presença de barragens sobre a fauna de peixes

A alteração de um ambiente lótico para um ambiente lêntico se dá gradualmente, levando à compartimentalização do reservatório em três regiões principais: a região lótica, a região de transição e a região lêntica (Tundisi, 1987). Essa mudança ambiental gradual pode ser dividida em duas fases: o enchimento e a colonização.

O período de enchimento de uma represa começa com o fechamento da represa e termina com o início da operação normal do reservatório (podendo durar de 8 a 80 dias). Estudos indicam que nos primeiros dias desse período, indivíduos de várias espécies de peixes ocupam todo o reservatório e toda a coluna d'água (perfil transversal de uma massa d'água), independente do tipo de habitat que ocupavam no rio ou que ocuparão no reservatório (Agostinho *et al.*, 1999). Com o aumento das zonas anóxicas (com pouco oxigênio dissolvido, devido ao aumento da concentração de nutrientes pela decomposição da matéria orgânica afogada), os peixes se dispersam em tributários do

reservatório e também no rio principal. As espécies que permanecem no reservatório concentram-se próximas aos tributários e em zonas litorâneas (Agostinho *et al.*, 1999).

O período seguinte ao enchimento é a colonização, que se inicia com a operação normal do reservatório e dura cerca de 15 anos. O processo de colonização depende muito da composição de espécies da comunidade natural e da estação do ano na qual ocorreu o enchimento, pois este fator interage com o período de migração e com o tempo de dispersão das espécies (Agostinho *et al.*, 1999).

De um modo geral, observa-se a tendência de uma maior diversidade na região riverina, devido à retenção das características do ambiente lótico, e na região litorânea, devido a sua maior produtividade. Outro dado importante é que espécies sedentárias e de médio porte tornam-se dominantes em detrimento das espécies migradoras e de grande porte (Agostinho *et al.*, 1999).

A redução da disponibilidade de alimento devido à inundação da mata ciliar e a diminuição da relação perímetro/lâmina d'água geram um impacto que resulta na escassez de alimento alóctone disponível (insetos, frutos e folhas), sendo assim, espécies frugívoras são afetadas de forma mais intensa (Martins, 2000). Alterações no plâncton dos rios, causadas pelas barragens (especialmente o efeito cumulativo delas), podem, também, impactar as espécies de peixes que se alimentam desse recurso, especialmente as larvas.

Outro impacto importante é a perda de habitat, como ocorre com as lagoas marginais. Essas lagoas apresentam um papel importante para o ciclo de vida de alguns peixes (como o curimatá), pois são os locais de alimentação e abrigo dos alevinos.

Os impactos potenciais a montante incluem: o afogamento de quedas d'água, que leva à introdução de espécies nos segmentos a montante, devido à eliminação das barreiras naturais, e a ampliação das áreas lacustres da bacia, levando à proliferação de espécies sedentárias (Agostinho, 1994).

Os impactos a jusante incluem:

- O controle do nível d'água para a finalidade da barragem (seja geração de energia ou outra) muitas vezes causa alterações que são prejudiciais à fauna de peixes (gerando atenuação ou retardamento dos picos de cheias), interferindo nos abrigos, na alimentação e na desova (Martins, 2000).
- A retenção de sedimentos no reservatório causa o aumento da transparência da água (o que pode aumentar a mortalidade de jovens por predação) e a redução de alimentos bentônicos (Agostinho, 1994).

- A queda d'água do vertedouro ou a saída da água da turbina podem apresentar supersaturação gasosa, levando à mortandade de peixes por embolia (Agostinho, 1994). Em operações de manutenção das turbinas, há concentração de peixes sob condições de baixo oxigênio, o que os leva à morte. Porém, com a conscientização ambiental crescente, algumas concessionárias de energia promovem operações de resgate de peixes com caminhões-tanque (Martins, 2000).
- Reduções súbitas na vazão a jusante levam à exposição do leito do rio, causando a mortandade de peixes por asfixia, temperatura ou dessecação (Agostinho, 1994).

As espécies mais afetadas pela construção de um reservatório são aquelas que dependem de longas migrações para se reproduzir, pois a construção de uma represa causa alterações na descarga e nas características físico-químicas dos rios, podendo bloquear ou atrasar a migração ascendente dos peixes e, portanto, contribuir para o declínio e mesmo a extinção de espécies que dependem de movimentos longitudinais durante certas fases do seu ciclo de vida (Larinier, 2000).

Alguns peixes orientam-se pela correnteza, como é o caso do curimatã (*Prochilodus*) e do dourado (*Salminus*), enquanto que outros se orientam pela topografia de fundo, como o pintado (*Pseudoplatystoma*).

Para que a reprodução seja bem sucedida é necessária a ocorrência conjunta de uma série de fatores, tais como: cheias grandes e prolongadas, que propiciam a formação das lagoas marginais (essenciais para o desenvolvimento das larvas); temperatura elevada e permanente, que aumenta a rapidez do desenvolvimento do ovo; turbidez pequena, que é favorável à desova e à incubação dos ovos (Azevedo, 1970); e efeitos hormonais produzidos pela fadiga muscular resultante do cansaço migratório (Godoy, 1970).

Outro fator da migração reprodutiva é que o movimento não ocorre constantemente num único sentido, ocorrem avanços e recuos devido à exaustão e/ou repouso, linhas de corrente desfavoráveis, ou a estagnação devido à intransponibilidade, como é o caso de barragens desprovidas de sistemas de transposição de peixes (STPs) (Martins, 2000).

Em alguns estados como, por exemplo, Minas Gerais e São Paulo, há leis (Leis n^{os} 12.488/97 e 9.798/97, respectivamente) que tornam obrigatória a construção de passagens para subida dos peixes, porém não foram realizados trabalhos a respeito da eficiência destas passagens para as espécies-alvo. Sendo assim, o represamento pode

causar obstrução total (todos os indivíduos), parcial (certos indivíduos) ou temporária (em certas épocas do ano) das espécies migradoras (Larinier, 2000).

Além disso, o restabelecimento da passagem de peixes rio acima é apenas um dos aspectos dos problemas induzidos por uma represa; há, ainda, o dano causado na migração descendente e os efeitos indiretos associados às mudanças ecológicas (Larinier, 2000). O acúmulo destes fatores, especialmente em represas altas ou em uma série de represas, pode comprometer o balanço e mesmo a sobrevivência das populações de peixes migratórios.

Efeitos irreversíveis ou de longa duração no ambiente aquático causam mudanças na estrutura genética, ou mesmo a extinção local, de certas espécies (Petts, 1984).

1.2 Histórico das barragens na área estudada

A bacia do Rio Grande está incluída na bacia do Alto Paraná, que vai da confluência dos rios Paranaíba e Grande até o Salto das Sete Quedas (Paiva *et al.*, 2002). Esta região drena uma área com grandes centros urbanos, industriais e agrícolas, e é a mais intensamente explorada do país, gerando mais de 70% da produção hidrelétrica (Agostinho & Júlio-Jr, 1999).

A bacia do Rio Grande cobre 161.000 km², dos quais 64% estão no estado de Minas Gerais, e o restante no estado de São Paulo (Paiva *et al.*, 2002).

Suas maiores sub-bacias são: Rio das Mortes, Rio Uberaba, Rio Verde, Rio Sapucaí, Rio Sapucaí-Mirim, Rio Pardo (34.960 km², dos quais 17.460 km² são da bacia do Rio Mogi-Guaçu) e Rio Turvo (Paiva *et al.*, 2002).

A área aqui estudada (figura 1) localiza-se na bacia do Rio Grande, e inclui os rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu. Nessa área existem atualmente 13 represas de hidrelétricas em uma distância fluvial de 1.072 km. Essa distância fluvial foi considerada para o presente estudo, pois corresponde à área delimitada por Toledo-Filho (1981) e Toledo-Filho *et al.* (1987) para o curimatá, com base nos dados de Godoy (1975) de marcação e recaptura de exemplares dessa espécie.

As represas acima citadas são: Usina Hidrelétrica (UHE) Mascarenhas de Moraes (antiga Peixoto) (FURNAS), UHE L.C.B. de Carvalho (antiga Estreito) (FURNAS), UHE Jaguará (CEMIG), UHE Igarapava (CEMIG), UHE Volta Grande (CEMIG), UHE Porto Colômbia (FURNAS) e UHE Marimbondo (FURNAS), no Rio

Grande; UHE Limoeiro (AES Pardo) e Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Itaipava (Vitercana Agro Mercantil S.A.), no Rio Pardo; PCH Salto de Pinhal/Pinhal (CPFL), UHE Mogi-Guaçu (AES Pardo) e PCH Emas Novas (Elektro-Eletricidade e Serviços S.A.), no Rio Mogi-Guaçu; e PCH Socorro (CPFL), no Rio do Peixe. Dentre estas, somente a UHE Igarapava, a PCH Itaipava, a UHE Mogi-Guaçu e a PCH Emas Novas possuem escadas para a subida de peixes.

Figura 1: a) Mapa mostrando a localização espacial da área estudada (destaque); b) Área estudada, mostrando a bacia do Rio Grande (na área delimitada em lilás), com alguns dos seus principais rios: Mogi-Guaçu, Pardo e Grande, e também o Rio do Peixe. Os triângulos pretos representam as usinas hidrelétricas que constam na área de estudo (percurso dos rios acima mencionados), a saber: 1) Peixoto; 2) Estreito; 3) Jaguará; 4) Igarapava; 5) Volta Grande; 6) Porto Colômbia; 7) Marimbondo; 8) Itaipava; 9) Limoeiro; 10) Emas Novas; 11) Mogi-Guaçu; 12) Salto de Pinhal e 13) Socorro. (Mapa extraído do sistema de visualização de mapas da HidroWeb, 2001).

Nesta região, as primeiras barragens construídas foram para a geração de energia de Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs), a saber: PCH Socorro (1909), PCH Itaipava (1914), PCH Pinhal (1928) e PCH Emas Nova (1942).

A PCH Itaipava foi a pioneira na América Latina a construir um sistema de transposição de peixes, do tipo escada com degraus, com 7 metros de altura vertical (Martins, 2000).

A PCH Emas Nova foi construída onde antes havia a usina de Emas Velha, cuja barragem foi construída em 1922. Esta usina também possui um sistema de transposição de peixes do tipo escada com orifícios, que, embora construído no início do século 20, só começou a funcionar após uma reforma realizada em 1942 (Godoy, 1985 *apud* Agostinho & Gomes, 2000). Esta usina encontra-se paralisada desde 1987 (Prado-Jr & Amaral, 2000).

A PCH Pinhal compartilha seu reservatório com a PCH Salto de Pinhal, que entrou em operação em 1911, e encontra-se desativada desde 1985 para a regularização do fluxo para a PCH Pinhal (Prado-Jr & Amaral, 2000).

A PCH Socorro esteve paralisada de 1971 a 1994, mas atualmente encontra-se em operação após uma repotenciação em 1994. Esta usina integra-se ao Projeto para Educação Ecológica e Estudos do Meio Ambiente, implantado pela prefeitura do município de Socorro (Prado-Jr & Amaral, 2000).

Em 1957 foi construída a primeira Usina Hidrelétrica (UHE) da área aqui estudada. Localizada entre as Usinas de Furnas e de L.C.B Carvalho (Estreito), a Usina de Mascarenhas de Moraes (anteriormente denominada Usina de Peixoto), foi construída pela Companhia Paulista de Força e Luz (CPFL) e, em 1973, por determinação da Eletrobrás a usina foi incorporada a FURNAS (FURNAS, 2004).

As outras hidrelétricas desta região são: UHE Limoeiro (1958), UHE Estreito (1969), UHE Jaguará (1971), UHE Porto Colômbia (1973), UHE Volta Grande (1974), UHE Marimbondo (1975), UHE Igarapava (1999) e UHE Mogi-Guaçu (1999).

Durante toda a obra da UHE Marimbondo, inclusive no período de enchimento do reservatório, FURNAS desenvolveu um amplo programa de proteção à fauna, visando a preservação do equilíbrio ecológico (FURNAS, 2004).

As UHEs Jaguará, Mogi-Guaçu e Igarapava também possuem escadas para transposição de peixes, sendo que a dessa última foi inaugurada em 2000. Na UHE Jaguará são observadas grandes mortandades de peixes a jusante do reservatório,

quando é época de migração, devido ao dessecamento e à diminuição do oxigênio dissolvido na água (Paiva *et al.*, 2002).

A maioria das usinas aqui descritas realizam programas de piscicultura voltados para o repovoamento dos rios. Nesses programas são soltos alevinos de várias espécies, incluindo alevinos de curimbatá. As usinas são:

- PCH Pinhal e PCH Socorro (CPFL), sendo que os alevinos são provenientes da estação de piscicultura da usina de Jaguari (Campinas, SP), e são soltos (cerca de 300.000 indivíduos) entre março e abril. Além destas solturas, a empresa realiza outras em rios e represas de usinas hidrelétricas nas regiões atendidas pela empresa (CPFL, 2004).
- UHE Mogi-Guaçu e UHE Limoeiro (AES Pardo), sendo que o repovoamento desses reservatórios é realizado pela empresa proprietária nas estações de piscicultura da UHE Barra Bonita e da UHE Promissão, com exemplares da população natural do trecho a ser repovoado (comunicação pessoal com a AES Pardo através da usina Euclides da Cunha). Outro fator que vale ser ressaltado é a venda de alevinos ao público em geral, promovida pelo site da empresa (AES Tietê, 2004).
- UHE Volta Grande (CEMIG), onde encontra-se um centro de pesquisas que investiga os impactos da implantação de uma hidrelétrica na estrutura das comunidades aquáticas, e uma estação de piscicultura. A empresa realiza parcerias com universidades, como por exemplo a parceria com a UFMG para o levantamento da ictiofauna do reservatório. Além disso, realiza também programas de educação ambiental e monitoramento, através de marcação, do comportamento biológico e, especificamente, migratório dos peixes (CEMIG, 2004).
- UHE Peixoto, UHE Estreito, UHE Porto Colômbia e UHE Marimbondo (Furnas), sendo que a estação de piscicultura localiza-se na UHE Furnas (FURNAS, 2004).

1.3 O caso do curimbatá (*Prochilodus lineatus*) na bacia do Rio Grande.

O *Prochilodus lineatus* é um peixe de grande importância comercial na pesca da região do Rio Mogi-Guaçu. Esta espécie realiza migrações tróficas a jusante (entre janeiro e agosto) e reprodutivas a montante (na época de primavera) na região de Cachoeira de Emas, Rio Mogi-Guaçu (Godoy, 1975). Possui naturalmente grande amplitude migratória (600-700 km aproximadamente), onde o Alto Mogi-Guaçu (entre

Cachoeira de Emas e Salto de Pinhal) seria o lar de reprodução e o Médio Rio Grande (entre Cachoeira do Marimbondo e a barragem da hidrelétrica de Peixoto) o lar de alimentação, crescimento e engorda (Toledo-Filho *et al.*, 1986; 1987).

Segundo Paiva *et al.* (2002), no momento da desova, que só ocorre quando o rio está subindo, o óvulo desta espécie mede 1 mm de diâmetro. Após a fecundação, que ocorre na correnteza do rio, o ovo se hidrata (em cerca de 3 a 5 minutos), o que aumenta seu diâmetro para 4 a 5 mm. Então, os milhões de ovos flutuam e são carregados pela correnteza do rio, que está enchendo, até as lagoas marginais (de águas paradas). Nestas lagoas, os ovos permanecem cerca de 24 horas, após as quais nasce a larva (de aproximadamente 3 mm de comprimento), que após 36 horas (tempo de reabsorção dos sacos vitelinos) passa a se alimentar de zooplâncton. Esta alimentação persiste pelos primeiros 25 dias de vida, depois dos quais a dentição especial cai e a boca se modifica, tornando-se protáctil. Os alevinos, então, passam a se alimentar de seres microscópicos que vivem no lodo.

Quanto à delimitação populacional, segundo Godoy (1975) os limites naturais das espécies de piracema (migração ascendente visando à reprodução) do Rio Mogi-Guaçu seriam: a montante, o Salto de Pinhal e uma cachoeira no percurso do Rio do Peixe (poucos quilômetros abaixo da cidade de Socorro, SP), e a jusante, a Cachoeira do Marimbondo.

Toledo-Filho (1981), trabalhando com dados de marcação obtidos por Manuel Pereira de Godoy entre 1954 e 1965, e resenhados em Godoy (1975), delimitou a área populacional do curimatá, abrangendo a bacia do Rio Mogi-Guaçu a jusante de Salto de Pinhal, a bacia do Rio Pardo a jusante da barragem de Limoeiro e a bacia do Rio Grande entre as barragens de Peixoto (a montante) e a Cachoeira do Marimbondo (a jusante) (figura 2).

Figura 2: Mapa que indica (triângulos pretos) os limites delimitados por Toledo-Filho (1981). As usinas são: 1) Peixoto; 2) Marimbondo; 3) Limoeiro; 4) Salto de Pinhal e 5) Socorro.

Segundo Paiva *et al.* (2002), a presença de peixes de piracema (incluindo o *Prochilodus lineatus*) nos reservatórios do Rio Grande, indica que há condições efetivas de reprodução, apesar da impossibilidade de migrações a montante no curso principal do rio. Porém, os autores acima citados fazem uma observação sobre os programas de peixamento realizados pelas empresas concessionárias da geração de energia elétrica.

Análises populacionais realizadas por Barbieri *et al.*, (2000) no Rio Mogi-Guaçu mostraram que no primeiro ano de vida do curimatá ocorre um crescimento rápido em comprimento, até os exemplares atingirem o tamanho da primeira maturação gonadal, entretanto, o inverso ocorre em relação ao crescimento em peso. Os autores sugerem, com base nas estimativas de tamanho (aproximadamente 24,5 cm), idade da primeira maturação gonadal, taxa de crescimento e valores assintóticos de comprimento e peso, que *Prochilodus lineatus* do Rio Mogi-Guaçu possui capacidade de auto-regulação populacional. Essa capacidade de auto-regulação, associada às condições físico-químicas do Rio Mogi-Guaçu, incluindo o reduzido número de barragens que impeçam a migração dos peixes, está, segundo os autores, favorecendo a preservação e a manutenção da espécie no ecossistema.

1.3.1 Características da espécie *P. lineatus*

As espécies da família Prochilodontidae (onde está incluído o gênero *Prochilodus*) possuem como características em comum corpo de porte médio a grande, iliofagia (alimentam-se de detritos nos fundos lamacentos), reofilia (dependem da correnteza do ambiente natural fluvial) e capacidade migratória durante o período de piracema. O gênero *Prochilodus* destaca-se por sua ampla distribuição na região Neotropical, e possui 13 espécies descritas até o momento (Reis *et al.*, 2003).

Quanto à morfologia, os representantes desse gênero possuem lábios grossos, móveis e providos de denticulos (Magalhães, 1931), escamas ctenóides (Castro, 1990) formando o anel etário durante a época de desova (Godoy, 1975).

Espécies de *Prochilodus* são conhecidas no Brasil pelos nomes populares de curimatá, curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra e corimatá. As espécies de *Prochilodus* possuem características reprodutivas em comum, tais como: desova única por temporada com elevado número de óvulos, fecundação externa e ausência de cuidado parental (Lowe-McConnell, 1999).

A espécie *P. lineatus*, conhecida popularmente como curimatá, encontra-se amplamente distribuída em toda a bacia dos rios Paraná-Paraguai e no Rio Paraíba do Sul (na costa sudeste do Brasil) (Castro, 1990). Entre as características diagnósticas de *P. lineatus* estão: nadadeira caudal sem manchas negras, presença de linha lateral completa com 44 a 50 escamas e presença de 42 a 44 vértebras (Castro, 1990).

Segundo Pauls (1985), *P. lineatus* apresenta $2n = 54$ cromossomos com a presença de constrição secundária no braço longo do segundo par de metacêntricos, correspondendo à região organizadora de nucléolo (RON). A autora acima constatou a presença de cromossomos supranumerários (cromossomos B), variando em número de 0 a 5, com maior frequência de 1 a 3 cromossomos B por célula, o que poderia ser considerado como característica da espécie.

1.4 Importância da conservação e formas de manejo dos recursos pesqueiros continentais

O interesse pela conservação da natureza surgiu na sociedade contemporânea à medida que esta se conscientizou da grave crise ambiental que enfrentamos. Durante as últimas décadas, várias comunidades biológicas, que abrigam diversas espécies, têm sido rapidamente devastadas pela ação humana.

A devastação ou fragmentação do habitat, aliada à exploração excessiva dos organismos aquáticos e terrestres, são as principais causas das extinções contemporâneas (Rozzi *et al.*, 2001).

As alterações ambientais podem ser deliberadas (como, por exemplo, a construção de uma usina hidrelétrica) ou acidentais, que são ocasionadas pelo desconhecimento dos sistemas ecológicos e pelo predomínio dos interesses econômicos a curto prazo (Rozzi *et al.*, 2001).

Alterações ambientais podem afetar as condições de vida dos organismos e podem ocasionar redução da diversidade biológica (Britski, 1995). As espécies mais afetadas, segundo Primack *et al.* (2001), são aquelas que possuem: distribuições geográficas restritas, populações pequenas, tamanho populacional em declínio, baixa densidade populacional, espécies de grande porte e que requerem uma área extensa para sobreviver, espécies que requerem um nicho especializado, espécies com baixa variabilidade genética, e espécies migradoras.

Um ramo importante da biologia da conservação é a conservação genética, que investiga a variabilidade genética de populações ou espécies no contexto temporal e/ou espacial. Pesquisas em genética de populações são de fundamental importância quando se pensa na elaboração de projetos visando à conservação de recursos naturais, levando ao enfoque o papel desempenhado pelas variações do genoma em resposta às mudanças ambientais, particularmente àquelas de origem antropogênica (Marques, 2002). O objetivo principal de programas de manejo e monitoramento genético em peixes, por exemplo, tem sido o de contribuir para a conservação do potencial biológico de populações selvagens, cujo hábitat tenha sido alterado, e que corram, portanto, risco de redução ou até mesmo de extinção (Toledo-Filho *et al.*, 1992).

Em várias partes do mundo o manejo da ictiofauna, seja ele no contexto da conservação da biodiversidade ou pela manutenção e incremento da produção pesqueira, tem forte apelo sócio-econômico e ambiental. Por isso mesmo tem sido alvo de grandes esforços em conhecimento e recurso financeiro por parte das iniciativas públicas e privadas (Sirol, 2003).

No Brasil, durante décadas e até hoje, são vários os programas de repovoamento que utilizam a premissa básica conservacionista, praticada em ambientes naturais que sofreram ou sofrem severa ação antrópica (estuários, rios e reservatórios) que têm por objetivo a manutenção da diversidade das espécies e a manutenção da produção pesqueira. Contudo, até hoje, apesar dos enormes esforços realizados, não temos um exemplo nacional de sucesso (Sirol, 2003).

São vários os fatores que colaboram para a ausência de resultados significativos no repovoamento com espécies nativas no Brasil. Dentre eles, podemos destacar a falta de conhecimento da biologia e principalmente da ecologia das espécies tropicais. É importante considerar que só se pode preservar aquilo que se conhece.

Outros fatores são as novas interações dessas espécies com os fatores bióticos e abióticos dos ambientes alterados, o que invariavelmente define o sucesso do programa de manejo da ictiofauna. Inclusive, a drástica transformação do ambiente e a conseqüente alteração das condições ecológicas é o que leva ao insucesso desses programas com as espécies nativas (Sirol, 2003).

No caso de alterações causadas por reservatórios, temos que estudar e aprender muito com as barragens já implantadas, e isso depende da visão, cada vez mais ampla e aberta, dos que gerenciam bacias hidrográficas e implementam as medidas que visam ao manejo da fauna (Britski, 1995).

Quando o assunto é preservação, os leigos se preocupam apenas com as espécies de porte maior ou espécies de importância econômica, sem se dar conta que elas não poderiam subsistir na natureza sem a presença das demais que compõem seu ambiente (Britski, 1995). No caso da bacia do Alto Paraná, que possui reservatórios em cascata, devemos nos preocupar especificamente com os peixes migradores, que, por dependerem de movimentos longitudinais para se reproduzir, sofrem um impacto ainda maior.

Os programas mais modernos de manejo da ictiofauna utilizam diversas técnicas para alcançar seus resultados, entre elas, podemos destacar a implantação de períodos de defeso, definição de cotas de captura, normatização dos tipos de equipamentos permitidos para captura, vitalização das áreas de desova e crescimento, potencialização de ambientes naturais, recuperação de ambientes degradados, educação ambiental, repovoamento, estudos de facilidades para transposição de peixes migradores, entre outros.

As medidas de atenuação dos impactos causados pelas barragens podem ser divididas em:

- Manejo das populações de peixes, que inclui: repovoamento, sistemas para a transposição de peixes, e salvamentos.
- Manejo do ambiente aquático, que inclui: vitalização das áreas de desova e crescimento, e recuperação de ambientes degradados.
- Manejo da pesca, que inclui: normatização dos tipos de equipamentos permitidos, cotas de captura, e períodos de defeso.

1.4.1 Manejo das populações de peixes

O processo de repovoamento passa pela escolha das espécies a serem utilizadas no programa, que deve levar em conta a exigência legal de serem espécies naturais da bacia e, também, a legislação de proteção à biodiversidade brasileira, que pressupõe que os alevinos possuam o mesmo material genético das populações selvagens locais (Sirol, 2003). Por isso, é essencial conhecer a variabilidade genética das populações naturais de peixes.

Outra forma de manejo trata dos sistemas para transposição de peixes (STP), sendo que, no caso do Brasil, as escadas são o único sistema existente (Muller, 1995). Algumas leis estaduais tornam obrigatória a construção de passagens para subida dos

peixes, entretanto, a implantação das escadas para peixes só deve ser realizada após estudos ambientais e da avaliação da sua real necessidade. No caso de se constatar a importância ecológica da escada para a reprodução dos peixes, os empreendedores terão cinco anos para implantá-las.

A escassez de estudos acerca da eficiência das escadas de peixes no contexto da conservação da ictiofauna deve-se principalmente à complexidade desses estudos, que devem compreender quatro etapas: a) a caracterização da ictiofauna regional e a inserção da escada; b) o desenho da escada e a sua eficiência na transposição; c) a continuidade da migração reprodutiva; d) a migração descendente e a passagem pela barragem. (Agostinho & Gomes, 2002).

A primeira etapa inclui o conhecimento da biodiversidade de peixes, a averiguação da existência ou não de espécies migradoras, a localização das áreas críticas ao ciclo de vida destas espécies e sua localização em relação ao eixo da barragem, e a existência de locais propícios à desova ou à continuidade da migração reprodutiva a montante da barragem.

A segunda etapa inclui um aspecto crítico para a eficiência da escada que é o mecanismo de atração, pois, se a entrada não for prontamente reconhecida pelas espécies-alvo, a migração pode ser atrasada ou, até mesmo, bloqueada (Agostinho & Gomes, 2002). Esta etapa inclui ainda a avaliação da eficiência das escadas, sendo que, neste contexto, pouco foi feito. Algumas avaliações sugerem que, em barragens com altura inferior a 16 metros, as escadas são eficientes como STPs (Agostinho & Gomes, 2002). Porém, a eficiência destes mecanismos depende da realização de um desenho satisfatório para as espécies-alvo. Dizemos espécies-alvo, pois todo o mecanismo de transposição de peixes é seletivo, sendo assim, somente as espécies selecionadas para a transposição conseguirão utilizar a escada.

A terceira etapa diz respeito à continuidade da migração reprodutiva, pois após a espécie-alvo transpor a barragem encontrará um ambiente lântico, sem indicativos, pela ação da correnteza, de onde se localiza a saída do reservatório. Porém, segundo Agostinho & Gomes (2002), há, atualmente, uma forte evidência de que isto não se constitua um problema relevante, pois estudos de marcação e recaptura realizados com *Prochilodus lineatus* e *Pterodoras granulosus*, em Itaipu, mostraram que estas espécies conseguiram seguir a montante do rio a partir do reservatório.

A última etapa, que trata sobre passagem do resultado da desova da montante para a jusante através da barragem, segundo Agostinho & Gomes (2002), envolve dois

fatores críticos: as larvas e juvenis devem atravessar todo o corpo do reservatório até a barragem, e devem passar pela barragem com um mínimo de mortalidade.

Operações de salvamento também podem ser utilizadas como forma de manejo, neste caso, métodos de captura a jusante e soltura a montante são empregados. Métodos de captura incluem o uso de armadilhas de atração em quedas d'água artificiais, como, por exemplo, “escadas” com um só tanque localizadas em pontos com alta concentração de cardumes, entre outras. O transporte pode ser feito por caçambas, guindastes ou caminhões-tanque (Muller, 1995).

Uma das vantagens desta técnica é que podem ser realizadas triagens dos peixes soltos no reservatório, além de marcação para estudos sobre a biologia destas espécies, e registro de tamanho e quantidade de cada espécie.

1.4.2 Manejo do ambiente aquático

Nesta forma de manejo, a intervenção ocorre sobre o meio aquático, como por exemplo, em períodos que favorecem ou prejudicam as fases reprodutivas e juvenis ou a disponibilidade de alimentos. Como um exemplo prático podemos citar as oscilações do nível d'água e o controle de plantas aquáticas (Müller, 1995).

Outro aspecto é a recuperação de ambientes degradados, porém, além de consumir muito dinheiro, a recuperação de um rio degradado (melhorando a qualidade da água), não é garantia de que as comunidades originais possam ser restabelecidas (Britski, 1995).

1.4.3 Manejo da pesca

Este tipo de manejo trata das leis, decretos ou portarias de proteção à fauna aquática. O site do IBAMA disponibiliza estas resoluções relacionadas à normatização da pesca, tanto federais quanto estaduais.

Tais resoluções incluem: normatização dos tamanhos mínimos de captura e transporte de diversas espécies, normatização dos equipamentos permitidos para a captura de diversas espécies, proibições da pesca em determinados trechos do rio (devido ao perigo de extinção local), estabelecimento de proibições devido ao período de piracema (atendendo às necessidades regionais), entre outras.

Para a exploração dos recursos pesqueiros de uma maneira permanente e rentável, é necessário um monitoramento contínuo que norteie a aplicação de técnicas de manejo capazes de levar a um aumento na produção pesqueira, assim como contribuir para a manutenção das espécies. Sob este aspecto podemos citar a resolução que ampliou o tempo de defeso (devido à piracema) das espécies migradoras da bacia do Rio Grande, devido ao acidente ocorrido no Rio Pardo em 2003, no qual milhares de peixes, de várias espécies, morreram asfixiados pela mistura de melaço à água do rio, devido ao rompimento de um muro de concreto de um reservatório de melaço da Usina da Pedra (Serrana, SP).

Todas as formas de manejo visam à conservação da ictiofauna, em especial a conservação da sua diversidade genética. Estudos com marcadores citogenéticos e genético-moleculares fornecem parâmetros de estimativa da diversidade genética, e têm contribuído grandemente na elucidação de questões relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de peixes (Marques, 2002).

1.5 O uso de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) em estudos populacionais de peixes

A detecção e a caracterização dos padrões genético-populacionais são de fundamental importância para o planejamento adequado de programas de conservação, manejo e exploração dos Bancos Genéticos Selvagens das espécies nativas da ictiofauna Neotropical de água doce (Toledo-Filho *et al.*, 1999).

Em piscicultura já existem vários estudos empregando diversos marcadores genéticos, pois, antes de se iniciar o cultivo de um estoque, é imprescindível que se conheça a variabilidade genética da população fundadora (Toledo-Filho *et al.*, 1992).

Para a avaliação de estruturas populacionais em peixes há diversos marcadores genéticos disponíveis, associados tanto ao genoma nuclear como ao genoma mitocondrial.

Algumas características do DNA mitocondrial (mtDNA) que o tornam um marcador adequado para estudos evolutivos são: um genoma compacto com estrutura e organização simples, ausência de íntrons, pseudogenes e elementos transponíveis, alta taxa de substituição de nucleotídeos, herança predominantemente materna, conservação

do conteúdo gênico e facilidade de purificação, devido ao fato de possuir várias cópias por célula (Avice *et al.*, 1987).

O mtDNA constitui uma fonte ideal de marcadores genéticos, pois a maior parte de sua variabilidade encontra-se distribuída interestoques ao invés de intra-estoques, isto parece ocorrer porque o mtDNA é mais suscetível às consequências da deriva genética do que o DNA nuclear (nDNA) (Avice *et al.*, 1979a, b; Brown *et al.*, 1979).

O mtDNA apresenta uma taxa de substituição de nucleotídeos de 5 a 10 vezes superior à do nDNA, sendo a região controle, também conhecida como *D-loop* (*Displacement loop*), a mais variável (Brown *et al.*, 1979; Harrison, 1989).

Uma técnica que vem sendo bastante utilizada em estudos populacionais e de fluxo gênico é a técnica de RFLP, cujo polimorfismo observado baseia-se na presença ou ausência de seqüências específicas de DNA reconhecidas pelas enzimas de restrição. A vantagem do emprego da técnica de PCR-RFLP de regiões específicas do mtDNA, em relação à técnica de RFLP utilizando o genoma mitocondrial completo, é o baixo custo e a minimização da presença de artefatos nos resultados obtidos, já que a primeira constitui uma técnica mais simples e rápida.

Informações fornecidas pela análise do mtDNA têm-se mostrado úteis na identificação de diferentes bancos genéticos em populações intra-específicas na área de ictiologia (Avice, 1992; Calcagnotto, 1998). Ao acrescentar uma perspectiva filogeográfica à demografia e à estrutura populacional de uma espécie, os dados obtidos podem contribuir para um conhecimento mais profundo e uma melhor abordagem a respeito da diversidade genética (Avice, 1992).

González-Villaseñor & Powers (1990), trabalhando com *Fundulus heteroclitus* (um peixe distribuído na costa atlântica da América do Norte), identificaram, através de PCR-RFLP, duas grandes raças: uma ao norte e outra ao sul da área de distribuição.

Triantafyllidis *et al.* (1999) analisaram quatro regiões do mtDNA (citocromo *b*, *D-loop*, ND5 e ND6) em sete populações de *Silurus glanis* e três de *S. aristotelis* (Siluridae) e encontraram uma estruturação geográfica significativa, com a separação das espécies em clados diferentes, e com várias populações apresentando haplótipos restritos, podendo ser úteis como marcadores moleculares para programas de conservação e identificação de estoques em programas de piscicultura.

Em outro estudo, Ikeda & Taniguchi (2002) trabalharam com a região *D-loop* de duas subespécies, *Plecoglossus altivelis altivelis* e *P. altivelis ryukyuensis*, de grande importância comercial na pesca de água doce do Japão. A análise permitiu a separação

das subespécies, bem como de suas populações, além de sugerir um efeito de gargalo evolutivo (causado pela perda de hábitat por atividades humanas) para explicar a baixa variabilidade em *P. a. ryukyuensis* (que é restrita à ilha Amami-oshima), podendo até mesmo ser considerada como subespécie em risco de extinção.

Propusemos o presente estudo tendo em vista que muitos autores (Bernatchez & Dodson, 1991; Cliffrod *et al.*, 1998; Crosetti *et al.*, 1994; González-Villaseñor & Powers, 1990; Hansen & Loeschcke, 1996; Iguchi *et al.*, 1999; Ikeda & Taniguchi, 2002; Triantafyllidis *et al.*, 1999) são unânimes em afirmar que a técnica de PCR-RFLP possui grande poder de resolução, sendo útil, muitas vezes, para encontrar marcadores moleculares que possam ser aplicados em programas de conservação e manejo pesqueiro, além de fornecer hipóteses consistentes a respeito da estruturação populacional.

O presente trabalho tem como foco de estudo a estrutura populacional de *Prochilodus lineatus*, e os efeitos das barragens na população dessa espécie da bacia do Rio Grande, utilizando a restrição do DNA mitocondrial como marcador genético.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a estrutura populacional de *Prochilodus lineatus* na região da bacia do Rio Grande, na área delimitada por Toledo-Filho (1981) e Toledo-Filho *et al.* (1987) que nas últimas décadas foi alterada pela construção de diversas represas.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o estoque pesqueiro, já que as coletas foram realizadas diretamente com pescadores da região;
- Localizar os trechos de maior diversidade genética;
- Avaliar se as alterações ambientais provocadas pelas barragens geraram divergência genética significativa entre as amostras estudadas;
- Avaliar a principal fonte de variação genética, se dentro ou entre amostras;
- Avaliar a existência de fluxo migratório recente entre as localidades;
- Verificar o efeito do repovoamento nos estoques locais;
- Observar se as amostras passaram por um gargalo evolutivo;
- Verificar se há uma relação entre a geografia e a análise filogenética.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Foram analisados exemplares de *Prochilodus lineatus*, o curimbatá, provenientes da bacia do Rio Grande, coletados nos Rios Mogi-Guaçu, Pardo e Grande.

As coletas foram realizadas, diretamente com os pescadores, em pontos situados entre as barragens localizadas na área correspondente à delimitação populacional do curimbatá (Toledo-Filho, 1981; Toledo-Filho *et al.*, 1987), a saber: Usina Hidroelétrica (UHE) L.C.B. de Carvalho (Estreito), UHE Jaguará, UHE Igarapava, UHE Volta Grande, UHE Porto Colômbia, UHE Marimbondo, UHE Limoeiro, Pequena Central Hidroelétrica (PCH) Itaipava, PCH Salto de Pinhal, UHE Mogi-Guaçu, PCH Emas Nova e PCH Socorro. Outros três pontos localizados além da área delimitada também foram incluídos, a saber: a leste das barragens da PCH Salto de Pinhal e da UHE Mascarenhas de Moraes (Peixoto), e a oeste da UHE Marimbondo, totalizando 10 pontos de coleta (figura 3). As barragens com escadas de peixes não foram consideradas como barreiras, devido aos relatos encontrados na literatura que comprovam a eficiência das escadas na região estudada. No total, foram amostrados 158 indivíduos de *Prochilodus lineatus* (tabela 1).

Figura 3: Mapa mostrando as usinas hidrelétricas que constam na área de estudo. A saber: 1) Peixoto; 2) Estreito; 3) Jaguará; 4) Igarapava; 5) Volta Grande; 6) Porto Colômbia; 7) Marimbondo; 8) Itaipava; 9) Limoeiro; 10) Emas Novas; 11) Mogi-Guaçu; 12) Salto de Pinhal e 13) Socorro. Os triângulos pretos representam as usinas sem escada e os vermelhos as usinas com escada de peixes. Os círculos verdes representam os locais de coleta, sendo: a) Cardoso; b) Colômbia; c) Conceição das Alagoas; d) São Joaquim da Barra; e) Igarapava; f) Pedregulho; g) São João Batista do Glória; h) Jaborandi; i) Pirassununga e j) Espírito Santo do Pinhal (Mapa modificado do sistema de visualização de mapas da HidroWeb, 2001).

Tabela 1: Localidades de coleta, data e número amostral de *P. lineatus* da bacia do Rio Grande.

Localidade de coleta	Coordenadas geográficas	Data de coleta	Rio	Entre as barragens	Número amostral
Pirassununga, SP (PIR)	21° 59' 00" S 47° 25' 00" W	25/08/1998	Mogi-Guaçu	PCH Emas Nova e PCH Mogi-Guaçu	21
Cardoso, SP (CAR)	20° 05' 00" S 49° 55' 00" W	27/10/2003	Grande	a oeste da UHE Marimbondo	38
Jaborandi, SP (JAB)	20° 41' 17" S 48° 24' 45" W	03/04/2004	Pardo	PCH Itaipava/PCH Emas Nova e Porto Colômbia	16
Colômbia, SP (COL)	20° 10' 33" S 48° 41' 20" W	04/04/2004	Grande	UHE Porto Colômbia e UHE Marimbondo	30
Conceição das Alagoas, MG (ALA)	19° 54' 53" S 48° 23' 18" W	04/04/2004	Grande	UHE Porto Colômbia e UHE Volta Grande	10
São Joaquim da Barra, SP (BAR)	20° 35' 00" S 47° 51' 00" W	04/04/2004	Sapucaí	UHE Porto Colômbia e UHE Volta Grande	3
Igarapava, SP (IGA)	20° 02' 18" S 47° 44' 49" W	05/05/2004	Rio Grande	UHE Igarapava e UHE Jaguará	23
São João Batista do Glória, MG (GLO)	20° 38' 28" S 46° 30' 20" W	14/05/2005	Grande	UHE Mascarenhas de Moraes (antiga Peixoto) e UHE Furnas	10
Espírito Santo do Pinhal, SP (PIN)	22° 06' 57" S 46° 40' 58" W	18/09/2004	Mogi-Guaçu	a leste da PCH Salto de Pinhal	5
Pedregulho, SP (PED)	20° 15' 25" S 47° 28' 36" W	25/09/2004	Grande	UHE Jaguará e UHE L.C.B. de Carvalho (antiga Estreito)	12

Os três exemplares coletados em São Joaquim da Barra foram incluídos na amostra proveniente de Conceição das Alagoas, por pertencerem à mesma localidade de

interesse do Rio Grande, ou seja, entre as barragens da UHE Porto Colômbia e UHE Volta Grande.

3.2 Métodos

A extração do DNA total seguiu o protocolo padrão fenol:clorofórmio (modificado de Sambrook *et al.*, 1989), a partir de amostras de nadadeiras, conservadas em etanol 96%.

Duas regiões da molécula de DNA mitocondrial foram amplificadas por PCR (figura 4). Os *primers* utilizados na reação de amplificação foram:

- L5002 (5' - AACCAAACCCAACTACGAAAAAT - 3'), que hibrida em uma região inicial do gene NADH desidrogenase, subunidade 2 (ND2) (Macey *et al.*, 1997), e H6564 (5' -GGGTCTCCTTTCCTTCCAAAGCTGGGTC-3'), que hibrida em uma região intermediária do gene citocromo *c* oxidase, subunidade 1 (CO1) (Macey *et al.*, 1998). Esses *primers* amplificam um fragmento de aproximadamente 1.600 pb de tamanho.

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C de 2 min, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 45s e 72 °C por 1 min, e um período final de extensão a 72 °C por 7 min. Para aumentar o produto amplificado, duas ciclagens sucessivas foram realizadas, sendo que na primeira PCR foram utilizados 30ng de DNA molde e, na segunda PCR, utilizou-se 1 µl do produto de amplificação da primeira PCR.

- F-TTF (5' - GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA - 3') e F-12R (5' - GTCAGGACCATGCCTTTGTG - 3') hibridam nos genes para tRNA flanqueadores da região controle (Sivasundar *et al.*, 2001) (figura 5). Esses *primers* amplificam um fragmento de aproximadamente 1.370 pb de tamanho. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C de 5 min, seguida por 35 ciclos de 92 °C por 1 min, 53 °C por 30s e 70 °C por 90s, e um período final de extensão a 72 °C por 7 min. Para a realização da PCR foram utilizados 15ng de DNA molde.

Figura 4: Esquema da molécula de mtDNA. Modificado de Passarge (1995), extraído de Moysés (2005).

Figura 5: Esquema mostrando em destaque a região *D-loop* do mtDNA. Extraído de Moysés (2005)

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo e fotografado digitalmente sob luz ultravioleta.

Foram testadas no total 25 enzimas de restrição na região *D-loop* (por ser a região mais polimórfica), em exemplares de *Prochilodus lineatus* do Rio Mogi-Guaçu

(Pirassununga, SP), a saber: *AluI*, *ApaI*, *BamHI*, *BclI*, *BglI*, *ClaI*, *DdeI*, *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *KpnI*, *MboI*, *MluI*, *MspI*, *PstI*, *PvuII*, *RsaI*, *Sall*, *ScaI*, *StuI*, *XbaI* e *XhoI*.

Destas, selecionamos as seguintes: *AluI*, *BamHI*, *DdeI*, *DraI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MluI*, *MspI*, *PstI* e *PvuII*, num total de dez enzimas, tanto para a região entre os genes ND2 e CO1, quanto para a região *D-loop* do mtDNA.

Posteriormente, incluímos outras cinco enzimas para a restrição da região *D-loop*, são elas: *ClaI*, *MboI*, *RsaI*, *ScaI* e *StuI*, perfazendo, então, um total de 15 enzimas para essa região.

Os produtos de digestão foram visualizados em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo e fotografado digitalmente sob luz ultravioleta.

Todas as digestões foram realizadas segundo as especificações do fabricante, com 15 µl do produto de PCR, durante um período de oito horas.

3.3 Análise dos resultados

Os tamanhos dos fragmentos de restrição obtidos foram estimados com o auxílio do programa GEL 1.2 (Lacroix, 1993) através de dados de distância de migração e tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular.

Cada um dos diferentes padrões produzidos por uma enzima de restrição foi designado por uma letra maiúscula. Cada indivíduo foi identificado por um código de 10 (para a região entre os genes ND2 e CO1) e 15 letras maiúsculas (para a região *D-loop*), que juntas correspondem a um haplótipo, em cada segmento.

A análise dos haplótipos foi realizada em cada segmento separadamente.

A partir da análise de ganho/perda de sítios de restrição entre os padrões gerados por cada enzima separadamente (anexos 1 e 2), foi construída uma matriz de presença/ausência de sítios (0 = ausência e 1 = presença). A da região controle está apresentada no anexo 3).

Com essa matriz calculamos os valores de divergência de seqüências de nucleotídeos entre pares de haplótipos (d) (anexo4), diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h) e divergência nucleotídica (δ) entre amostras, estimados segundo Nei (1987), Nei & Li (1979), Nei & Miller (1990) e Nei & Tajima (1981).

A simulação de Monte Carlo (Roff & Bentzen, 1989) foi utilizada para testar a heterogeneidade das frequências haplotípicas geral e entre as amostras.

Todos estes cálculos foram efetuados com o auxílio do programa REAP (*Restriction Enzyme Analysis Package*) (McElroy *et al.*, 1992).

O teste F foi utilizado pra verificar se as diferenças entre os valores de d eram significativas. Este teste utiliza a distribuição de Fisher e compara as variâncias de duas matrizes de dados. Utilizou-se, para tanto, o programa Microsoft Office Excel (2003).

Outro teste de heterogeneidade utilizado foi o teste exato de diferenciação (Raymond & Rousset, 1995), que é análogo ao teste exato de Fisher. Este teste também foi utilizado para testar a heterogeneidade das frequências haplotípicas geral e entre as amostras.

Calculou-se, também, o índice F_{st} entre pares de amostras, o qual pode ser usado como uma estimativa da distância genética entre elas. A significância foi testada através de testes não-paramétricos de permutação, com índice de significância (α) de 0,05 (Excoffier *et al.*, 1992).

Tanto as análises acima quanto a análise da estrutura populacional foram realizadas com o auxílio do programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000).

A estrutura populacional foi averiguada empregando a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) para gerar estimativas da variância genética em diferentes níveis hierárquicos, e valores de estatística ϕ , que indicam o grau de subdivisão geográfica.

Os parâmetros de ϕ (ϕ_{CT} , ϕ_{SC} e ϕ_{ST}) são medidas de correlação para cada nível de subdivisão populacional. De maneira que ϕ_{CT} é a correlação de haplótipos retirados ao acaso de um grupo de populações em relação ao total da espécie; ϕ_{SC} é a correlação de haplótipos retirados ao acaso de uma população em relação aos haplótipos do grupo; e ϕ_{ST} é a correlação de haplótipos retirados ao acaso de uma população em relação ao total de haplótipos da espécie (Excoffier *et al.*, 1992).

Com o auxílio do programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000), foram realizados os testes de Mantel (que testa a significância da correlação entre matrizes, sendo que neste estudo foi testada a relação entre distância genética e distância fluvial), e testes de neutralidade: de Ewens-Watterson-Slatkin (F) (Slatkin, 1994; Slatkin, 1996), que produz resultados similares aos do teste de homozigosidade de Watterson, e se baseia na teoria de alelos neutros, levando em consideração a frequência dos haplótipos (pode ser

utilizado para testar a hipótese de equilíbrio populacional versus a presença de alelos vantajosos); de Tajima (D) (Tajima, 1989), que se baseia no modelo de sítios infinitos sem recombinação e compara duas estimativas de theta (θ); e de Fu (Fs) (Fu, 1997), que também se baseia no modelo de sítios infinitos sem recombinação e utiliza-se do número observado de diferenças de pares de base (retirado como uma estimativa de theta). Esse teste é mais sensível à expansão populacional, e possui nível de significância de 5% quando $P = 0,02$. Os parâmetros necessários (theta0, theta1 e tau) para calcular o tempo de expansão populacional também foram obtidos com o auxílio desse programa, assim como a distribuição *mismatch* da amostra total e das amostras individualizadas.

Com o auxílio dos programas PHYLIP 3.6 (Felsenstein, 2004) e TreeView 1.6.6 (Page, 1996), construímos filogramas, baseados nos algoritmos Neighbor-Joining e Fitch-Margoliash). As árvores foram geradas com base na distância genética de Nei (d) entre os haplótipos. Para as amostras, utilizamos apenas o algoritmo Neighbor-Joining, baseado na divergência de Nei (δ), F_{st} e “net nucleotide sequence divergence” (d_A). O valor de (d_A) é igual a $Pi_{XY} - (Pi_X + Pi_Y)/2$, onde Pi_{XY} é a diferença entre duas amostras (X e Y), e Pi_X e Pi_Y é a diferença encontrada dentro das amostras X e Y, respectivamente.

Com o programa Network 4.1.1.2 (Fluxus Technology, 2004) construímos redes de haplótipos, baseadas no algoritmo Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999), tanto para o conjunto de haplótipos quanto para os haplótipos dentro das amostras.

O presente trabalho pretende, assim, contribuir para um maior conhecimento da estrutura populacional de *Prochilodus lineatus* na bacia do Rio Grande, onde essa espécie possui grande importância comercial, avaliando também os possíveis impactos das represas nessa espécie migradora.

4. Resultados

4.1 Padrões de restrição do fragmento ND2-CO1 do mtDNA

Para esta região do DNA mitocondrial, foram encontradas dificuldades na otimização da amplificação, devido ao pouco produto de PCR obtido. Sendo assim, foram realizados diversos testes que indicavam que duas rodadas completas e sucessivas de amplificação geravam melhores resultados.

Foram analisadas três amostras: Pirassununga (PIR) do Rio Mogi-Guaçu, Jaborandi (JAB) do Rio Pardo e Conceição das Alagoas (ALA) do Rio Grande.

Os resultados obtidos para o fragmento ND2-CO1 foram difíceis de serem otimizados, por isso a qualidade das figuras foi afetada. A identificação dos padrões de banda foi rigorosa, sendo necessário repetir várias digestões para a identificação clara dos haplótipos. Foram incluídos apenas os indivíduos que tiveram seus padrões confirmados. Os resultados estão apresentados nas figuras abaixo (figuras 6 a 9).

Figura 6: Padrões de restrição observados após a digestão do fragmento ND2-CO1 do mtDNA, em indivíduos da amostra de Pirassununga, SP (PIR). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 7: Padrões de restrição observados após a digestão do fragmento ND2-CO1 do mtDNA, em indivíduos da amostra de Conceição das Alagoas, MG (ALA). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 8: Padrões de restrição observados após a digestão do fragmento ND2-CO1 do mtDNA, em indivíduos da amostra de Conceição das Alagoas, MG (ALA). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 9: Padrões de restrição observados após a digestão do fragmento ND2-CO1 do mtDNA, em indivíduos da amostra de Jaborandi, SP (JAB). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

A partir destes resultados foram calculados os tamanhos dos fragmentos de restrição obtidos em cada padrão de enzima (tabela 2).

Com estes padrões foi possível a montagem dos haplótipos para a região entre os genes ND2 e CO1. Foram encontrados 5 haplótipos no total, sendo o haplótipo I mais frequente em todas as amostras. Os haplótipos com suas respectivas frequências absolutas estão representados na tabela 3.

Tabela 2: Tamanho aproximado dos fragmentos de restrição obtidos com a técnica de PCR-RFLP do fragmento ND2-CO1.

Enzima	Padrão A	Padrão B	Padrão C
<i>AluI</i>	600 pb, 550 pb e 450 pb		
<i>BamHI</i>	1.600 pb	950 pb e 670 pb	
<i>DdeI</i>	350 pb, 350 pb, 280 pb, 280 pb, 200 pb e 150 pb		
<i>DraI</i>	750 pb e 750 pb		
<i>HaeIII</i>	450 pb, 450 pb, 250 pb e 230 pb	900 pb, 250 pb e 230 pb	
<i>HinfI</i>	570 pb, 350 pb, 350 pb e 280 pb	700 pb, 570 pb e 280 pb	500 pb, 350 pb, 350 pb e 280 pb
<i>MluI</i>	900 pb e 700 pb		
<i>MspI</i>	550 pb, 550 pb, 280 pb e 200 pb		
<i>PstI</i>	1.600 pb		
<i>PvuII</i>	1.600 pb	1.400 pb e 220 pb	

Tabela 3: Haplótipos do fragmento ND2-CO1 encontrados nas amostras analisadas, com suas respectivas frequências absolutas. A sequência de letras corresponde à ordem das enzimas: *AluI*, *BamHI*, *DdeI*, *DraI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MluI*, *MspI*, *PstI* e *PvuII*

	Haplótipos	Pirassununga	Jaborandi	C. das Alagoas	Total
I	AAAAAAAAAA	12	11	8	31
II	ABAAAAAAAA		1		1
III	AAAAAAAAAB			1	1
IV	AAAAABAAAA			1	1
V	AAAABCAAAA	1			1

A análise de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h) intrapopulacional, e divergência (δ) inter populacional, são apresentadas nas tabelas 4 e 5, a seguir.

Tabela 4: Valores de diversidade haplotípica e nucleotídica encontrados para cada amostra analisada.

Amostra	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica (%)
Pirassununga	0.1538 +/- 0.12610	0,61 %
Jaborandi	0.1667 +/- 0.13430	0,58 %
Conceição das Alagoas	0.3778 +/- 0.18128	1,16 %
Média	0.2328 +/- 0.00527	0,78 %

Os valores de diversidade mostraram uma baixa variabilidade haplotípica (média de 0.2328 +/- 0.00527) (tabela 4) aliada a uma baixa diversidade nucleotídica, exceto na amostra de Conceição das Alagoas, onde obtivemos o índice de 1,16 %, que pode estar relacionado à presença de três haplótipos divergentes nesta amostra.

Tabela 5: Valores de divergência (δ) encontrados entre as amostras.

	Jaborandi	Conceição das Alagoas	Pirassununga
Jaborandi			
Conceição das Alagoas	-0.000055		
Pirassununga	-0.000029	0.000021	

Os valores de divergência (δ) mostram que não há diferenciação entre as amostras, o que também é averiguado através da distribuição de Monte Carlo, que revelou heterogeneidade não significativa entre as frequências haplotípicas ($P = 0.1197$).

4.2 Padrões de restrição da região controle (*D-loop*) do mtDNA

Nesse item são apresentados os resultados da análise de PCR-RFLP da região controle do mtDNA, utilizando 15 enzimas de restrição. Optou-se por ampliar as análises desta região, pois a análise preliminar dos resultados obtidos com o fragmento ND2-CO1 mostrou-se pouco eficiente para o objetivo proposto de averiguar a existência de estruturação populacional na população fragmentada de curimbatá da bacia do Rio Grande.

Sendo assim, analisamos a estrutura populacional de nove amostras de *Prochilodus lineatus* (figuras 10 a 26), sendo duas do Rio Mogi-Guaçu (Pirassununga - PIR e Espírito Santo do Pinhal - PIN), outra do Rio Pardo (Jaborandi - JAB), e seis do Rio Grande (Cardoso - CAR, Colômbia - COL, Conceição das Alagoas - ALA, Igarapava - IGA, Pedregulho - PED, e São João Batista do Glória - GLO), avaliando a variabilidade genética encontrada para a região *D-loop*.

A figura 27 apresenta um esquema dos padrões de bandas encontrados para as 15 enzimas analisadas. As enzimas *Pst*I, *Pvu*II e *Stu*I não possuem sítio de restrição no fragmento amplificado.

Foram incluídos na análise apenas os indivíduos que tiveram os padrões de restrição confirmados.

Um único indivíduo da amostra de Colômbia apresentou um polimorfismo de tamanho de cerca de 250 pb adicionais ao tamanho de 1.370 pb encontrado para a região *D-loop* (figura 12). Este indivíduo foi excluído das análises por questões de homologia.

Com os padrões estimados foi possível a montagem dos haplótipos para a região *D-loop*. Foram encontrados 55 haplótipos no total. A quantidade de haplótipos por amostra está apresentada na tabela 6.

A partir dos resultados obtidos foram calculados os tamanhos dos fragmentos de restrição obtidos em cada padrão de enzima (tabela 7).

Tabela 6: Quantidade de haplótipos totais e compartilhados por amostra.

Amostra	Haplótipos totais	Haplótipos compartilhados	Nº amostral
Cardoso	10	6	29
Colômbia	16	7	29
Conceição das Alagoas	7	3	13
Igarapava	10	5	23
Pedregulho	8	4	11
São João Batista do Glória	2	2	10
Jaborandi	11	2	16
Pirassununga	12	6	18
Espírito Santo do Pinhal	3	1	5

Os haplótipos com suas respectivas frequências absolutas e relativas estão representados na tabela 8.

Figura 10: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Cardoso, SP (CAR). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 11: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Cardoso, SP (CAR). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 12: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Colômbia, SP (COL). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 13: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Colômbia, SP (COL). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 14: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Igarapava, SP (IGA). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 15: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Igarapava, SP (IGA). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 16: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Espírito Santo do Pinhal, SP (PIN). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 17: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos das amostras de Espírito Santo do Pinhal, SP (PIN) e São Joaquim da Barra, SP (BAR)*. As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 18: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de São João Batista do Glória, MG (GLO). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 19: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos das amostras de Espírito Santo do Pinhal, SP (PIN)* e São João Batista do Glória, MG (GLO). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 20: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos das amostras de Pedregulho, SP (PED) e São Joaquim da Barra, SP (BAR)*. As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 21: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Jaborandi, SP (JAB). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 22: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Jaborandi, SP (JAB). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 23: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Conceição das Alagoas, MG (ALA). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 24: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Conceição das Alagoas, MG (ALA). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 25: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Pirassununga, SP (PIR). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 26: Padrões de restrição observados após a digestão da região *D-loop* do mtDNA, em indivíduos da amostra de Pirassununga, SP (PIR). As enzimas utilizadas estão indicadas acima de cada figura e o marcador de peso molecular é o 100 pb DNA Ladder Plus.

Figura 27: Esquemas dos padrões de restrição encontrados na análise da região *D-loop* do mtDNA. O asterisco representa o esquema para as enzimas *PstI*, *PvuII* e *StuI*, que não possuem sítio de restrição no fragmento amplificado. MP = Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder Plus.

Tabela 7: Tamanho aproximado dos fragmentos de restrição obtidos na análise de restrição da região *D-loop* do mtDNA.

Enzima	Padrão A	Padrão B	Padrão C	Padrão D	Padrão E	Padrão F	Padrão G
<i>AluI</i>	1.120 pb, 100 pb e 80 pb	650 pb, 390 pb, 100 pb e 80 pb*	750 pb, 290 pb, 100 pb e 80 pb*	900 pb, 230 pb, 100 pb e 80 pb	390 pb, 390 pb, 290 pb, 100 pb e 80 pb*		
<i>BamHI</i>	1.370 pb	910 pb e 450 pb					
<i>DdeI</i>	950 pb e 410 pb	480 pb, 480 pb e 410 pb	730 pb, 410 pb e 230 pb	630 pb, 410 pb, 230 pb e 100 pb	570 pb, 410 pb, 230 pb e 150 pb	480 pb, 410 pb, 250 pb e 230 pb	410 pb, 350 pb, 250 pb, 230 pb e 100 pb
<i>DraI</i>	420 pb, 400 pb, 200 pb, 200 pb e 90 pb*	550 pb, 420 pb e 290 pb	450 pb, 420 pb, 290 pb e 130 pb	1.000 pb e 290 pb			
<i>HaeIII</i>	1.370 pb	700 pb e 570 pb	570 pb, 540 pb e 140 pb*				
<i>HinfI</i>	1.370 pb	1.000 pb e 290 pb	560 pb, 430 pb e 290 pb	850 pb, 290 pb e 150 pb			
<i>MluI</i>	1.370 pb	1.000 pb e 290 pb					
<i>MspI</i>	1.000 pb, 180 pb e 150 pb	630 pb, 330 pb, 180 pb e 150 pb					
<i>PstI</i>	1.370 pb						
<i>PvuII</i>	1.370 pb						
<i>ClaI</i>	650 pb e 630 pb						
<i>MboI</i>	850 pb, 250 pb, 180 pb e 50 pb*	1.100 pb, 180 pb e 50 pb*	850 pb, 430 pb e 50 pb*	1.370 pb			
<i>RsaI</i>	450 pb, 270 pb, 250 pb, 130 pb e 120 pb	500 pb, 450 pb, 130 pb e 120 pb	350 pb, 270 pb, 250 pb, 130 pb, 120 pb e 100 pb*				
<i>ScaI</i>	1.000 pb e 300 pb						
<i>StuI</i>	1.370 pb						

(*) Fragmento inferido.

Tabela 8: Haplótipos encontrados para a região *D-loop* do mtDNA e suas respectivas frequências absolutas e relativas (entre parênteses, e em porcentagem). CAR = Cardoso, COL = Colômbia, ALA = Conceição das Alagoas, IGA = Igarapava, PED = Pedregulho, GLO = São João Batista do Glória, JAB = Jaborandi, PIR = Pirassununga e PIN = Espírito Santo do Pinhal. A ordem das letras corresponde à ordem das enzimas: *AluI*, *BamHI*, *DdeI*, *DraI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MluI*, *MspI*, *PstI*, *PvuII*, *ClaI*, *MboI*, *RsaI*, *ScaI* e *StuI*.

Haplótipos		CAR	COL	ALA	IGA	PED	GLO	JAB	PIR	PIN
H1	AACCBABAAAAAAAAA	15 (51,7)	13 (44,8)	7 (53,8)	10 (43,5)	3 (27,3)	5 (50,0)		4 (22,2)	3 (60,0)
H2	AACCCBABAAAAAAAAA	5 (17,2)		1 (7,7)	1 (4,3)	2 (18,2)			1 (5,6)	
H3	ABCCBBAAAAAAAAAAA	1 (3,4)	1 (3,4)							
H4	AABCCBAAAAAAAAAAA	1 (3,4)								
H5	AAECBBABAAAAAAAAA	2 (6,9)								
H6	BACCBBAAAAAAAAAAA	1 (3,4)								
H7	ABACCBABAAAAAAAAA	1 (3,4)								
H8	BABCCBABAAAAAAAAA	1 (3,4)	1 (3,4)							
H9	CACBAAABAAAAAAAAA	1 (3,4)						1 (6,2)		
H10	AACBAAABAAAAAAAAA	1 (3,4)						2 (12,5)		
H11	AAGDBBABAAAAAAAAA		1 (3,4)							
H12	AAACBBABAAABAAA		1 (3,4)							
H13	DAACBBABAAAAAAAAA		2 (6,9)						1 (5,6)	
H14	ABCBBCAAAAAAAAAAA		1 (3,4)						1 (5,6)	
H15	AACCB CABAAABAAA		1 (3,4)							
H16	AACBCCA AAAABAAA		1 (3,4)							
H17	ABFCBBAAAAAAAAAAA		1 (3,4)							
H18	BBACCBABAAAAAAAAA		1 (3,4)							

Continuação da tabela 8.

Haplótipos		CAR	COL	ALA	IGA	PED	GLO	JAB	PIR	PIN
H19	AADCBBABAAAABAA		1 (3,4)							
H20	BBABCDAAAAAAAAA		1 (3,4)		1 (4,3)					
H21	CACCBABAAAABAAA		1 (3,4)							
H22	CACCBABAAAAAAAA		1 (3,4)	1 (7,7)					2 (11,1)	
H23	AACCBABAAACAAA		1 (3,4)							
H24	DACCBABAAAAAAAA			1 (7,7)						
H25	AACCB BBBAAAAAAAA			1 (7,7)						
H26	AACCBABAAAABAAA			1 (7,7)						
H27	AAACBBABAAAAAAAA			1 (7,7)						
H28	BACCBABAAACAAA				1 (4,3)					
H29	AAACCBAAAAAACAA				1 (4,3)					
H30	AACCB BAAAAAAAAA				3 (13,0)					
H31	EABCCBABAAAAAAAA				2 (8,7)	1 (9,1)				
H32	AACBBBABAAAAAAAA				2 (8,7)		5 (50,0)		2 (11,1)	
H33	BACCBABAAAAAAAA				1 (4,3)	1 (9,1)				
H34	AACBB BAAAAAAAAA				1 (4,3)					
H35	BACCCBABAAAAAAAA					1 (9,1)				
H36	AACCB CABAAAAAAAA					1 (9,1)				
H37	AACCBABAAAABAA					1 (9,1)				
H38	AABCCBABAAAAAAAA					1 (9,1)				
H39	BACCAAABAAAAAAAA							1 (6,2)		

Continuação da tabela 8.

Haplótipos		CAR	COL	ALA	IGA	PED	GLO	JAB	PIR	PIN
H40	AACCAAABAAACAAA							1 (6,2)		
H41	AACCAAABAAAAAAA							5 (31,2)		
H42	BABCAAABAAAAAAA							1 (6,2)		
H43	AAACAAABAAAAAAA							1 (6,2)		
H44	AACAAAAAAAABAAA							1 (6,2)		
H45	BBABAAAAAAA							1 (6,2)		
H46	DAACAAABAAAAAAA							1 (6,2)		
H47	CAACAAABAAAAAAA							1 (6,2)		
H48	AADCBBABAAAAAAA								1 (5,6)	
H49	DACCBCABAAABAAA								1 (5,6)	
H50	AAABBBABAAAAAAA								1 (5,6)	
H51	AACABBABAAAAAAA								2 (11,1)	
H52	ABCCCBABAAAAAAA								1 (5,6)	
H53	BBCCCBABAAAAAAA								1 (5,6)	
H54	AACCBBAABAAA									1 (20,0)
H55	AAECBBABAAADAAA									1 (20,0)
Total		29	29	13	23	11	10	16	18	5

Do total de haplótipos obtidos (55), 13 são compartilhados entre amostras e 42 são restritos, sendo quatro restritos à amostra de Cardoso, nove restritos à amostra de Colômbia, quatro restritos à amostra de C. das Alagoas, quatro restritos à amostra de Igarapava, quatro restritos à amostra de Pedregulho, nove restritos à amostra de Jaborandi, seis restritos à amostra de Pirassununga e dois restritos à amostra de E. S. do Pinhal (tabela 8).

A distribuição haplotípica dentro das amostras estudadas pode ser visualizada na figura 28, onde os haplótipos restritos de cada amostra foram agrupados. Posteriormente, esses gráficos foram plotados sobre o mapa da área estudada (figura 29).

Com a averiguação dos sítios de restrição presentes em cada padrão de enzima (anexo 1) foi possível construir uma matriz de presença/ausência de sítios de restrição (anexo 3). Com esta matriz, foi construída a rede de haplótipos total (figura 30) e a rede de haplótipos de cada uma das amostras (figuras 31 e 32) para a melhor visualização das relações entre os haplótipos. O haplótipo 1 aparece como ancestral em todas as amostras, exceto em Jaborandi, onde o haplótipo 41 aparece como ancestral. Porém, pode-se perceber na figura 30 que o haplótipo 41 está conectado ao haplótipo 1. A figura 30 evidencia a relação complexa dos haplótipos, mostrando várias conexões possíveis.

Com a matriz de presença/ausência, foi possível estimar os valores de d (divergência entre os pares de haplótipos) (anexo 4), que variaram de 0,47 a 5,63 (com média de $2,19 \pm 1,13$) dentro das amostras, e de 0,48 a 7,99 (com média de $2,83 \pm 1,29$) entre amostras. Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de d encontrados dentro e entre amostras ($P(F) = 0,000$). Os valores de d apresentados estão em porcentagem. A tabela 9 mostra os valores mínimos, máximos e médios de d obtidos em cada amostra. Na amostra de São João Batista do Glória obtivemos dois haplótipos com d igual a 0,56.

Na figura 33 apresentamos dois filogramas baseados na distância d , um utilizando o algoritmo Neighbor-Joining (que não depende de taxas de evolução constantes), e o outro o algoritmo de Fitch-Margoliash (que produz resultados similares aos encontrados com NJ, mas baseia-se na menor soma dos quadrados das diferenças). Uma diferença entre as duas árvores é a presença de um agrupamento, na árvore Fitch-Margoliash, dos haplótipos encontrados na amostra de Jaborandi.

Na análise intra amostral foram obtidos os índices de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h), apresentados na tabela 10.

Tabela 9: Valores mínimos, máximos e médios de divergência entre pares de haplótipos (d) obtidos em cada amostra

Amostra	Divergência entre haplótipos		
	Mínimo	Máximo	Média
Cardoso	0,51	5,46	$2,35 \pm 1,24$
Colômbia	0,51	5,63	$2,61 \pm 1,13$
Conceição das Alagoas	0,51	1,15	$0,91 \pm 0,25$
Igarapava	0,51	3,98	$2,08 \pm 1,10$
Pedregulho	0,49	3,36	$1,48 \pm 0,84$
Jaborandi	0,57	5,33	$2,21 \pm 1,18$
Pirassununga	0,47	3,48	$1,95 \pm 0,78$
Espírito Santo do Pinhal	1,12	3,79	$2,40 \pm 1,34$

Tabela 10: Valores de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) encontrados para cada amostra analisada.

	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica (%)
CAR	$0,7143 \pm 0,08298$	1,01
COL	$0,8054 \pm 0,07714$	1,76
ALA	$0,7308 \pm 0,13321$	1,68
IGA	$0,8024 \pm 0,07774$	1,72
PED	$0,9273 \pm 0,06647$	1,92
GLO	$0,5556 \pm 0,07454$	0,82
JAB	$0,9083 \pm 0,06326$	3,18
PIR	$0,9412 \pm 0,03881$	2,31
PIN	$0,7000 \pm 0,21836$	1,55
Média	$0,7872 \pm 0,00178$	1,77

CAR = Cardoso, COL = Colômbia, ALA = Conceição das Alagoas, IGA = Igarapava, PED = Pedregulho, GLO = São João Batista do Glória, JAB = Jaborandi, PIR = Pirassununga e PIN = Espírito Santo do Pinhal.

Legenda

Figura 28: Gráficos de frequência dos haplótipos dentro das amostras estudadas.

Figura 29: Mapa esquemático mostrando os haplótipos compartilhados entre as localidades estudadas. A legenda é a mesma da figura anterior.

Figura 30: Rede total de haplótipos encontrados para a região *D-loop* do mtDNA. SQ = haplótipo. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos.

Colômbia

Igarapava

Pedregulho

Conceição das Alagoas

Figura 31: Redes de haplótipos encontrada dentro das amostras de Colômbia, Igarapava, Pedregulho e Conceição das Alagoas. Em amarelo estão os haplótipos compartilhados com outras amostras. SQ = haplótipo. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos.

Cardoso

Jaborandi

Pirassununga

Espírito Santo do Pinhal

Figura 32: Redes de haplótipos encontrada dentro das amostras de Cardoso, Jaborandi, Pirassununga e Espírito Santo do Pinhal. Em amarelo estão os haplótipos compartilhados com outras amostras. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. SQ = haplótipo. mv = haplótipos inferidos.

Figura 33: Filograma obtido a partir da distância genética (d), mostrando a relação entre os haplótipos encontrados. Destacados estão os haplótipos de Jaborandi.

Foram realizados três tipos de testes de neutralidade (tabela 11). O teste F de Ewens-Watterson (Slatkin, 1994; Slatkin, 1996) revelou que as amostras não estão em equilíbrio. A amostra de São João Batista do Glória é a que mais se aproxima do equilíbrio, porém a presença de apenas dois haplótipos com a mesma frequência pode ter influenciado. Podemos notar que os valores de P para as outras amostras são altos, isso é reflexo da presença de haplótipos mais frequentes.

O teste D (Tajima, 1989) revelou um valor significativo para a amostra de Conceição das Alagoas. Porém, um valor significativo pode aparecer devido a efeito seletivo, expansão populacional, gargalo, ou heterogeneidade das taxas de mutação. Entretanto, valores não significativos, mas negativos, podem ser um indício de expansão populacional.

Para tentar saber qual fator foi responsável pelo valor significativo de D, utilizamos o teste Fs (Fu, 1997), que é mais sensível para se detectar expansão populacional, gerando resultados bastante negativos. Na tabela 11 pode-se notar que a maioria das amostras passou por um evento de expansão populacional, com exceção de Igarapava, que apresenta um valor próximo do significativo (para este teste, a significância de 5% é obtida para valores de P inferiores a 0,02), e São João Batista do Glória e Espírito Santo do Pinhal, que apresentam pequeno número amostral e também de haplótipos.

As figuras 34 e 35 mostram gráficos da distribuição *mismatch* com os valores observados e os simulados segundo a hipótese de expansão populacional para o conjunto de amostras e para as amostras individualizadas, exceto Jaborandi que apresenta o modelo de expansão no lugar dos valores simulados. Em quase todas as figuras é possível perceber a forma de sino (curva unimodal) e a concordância das curvas observadas e simuladas. Este é mais um indício de expansão populacional.

Como em quase todas as amostras há evidência de expansão populacional, seria mais parcimonioso pensar que o evento de expansão ocorreu quando todas constituíam uma única população (figura 35).

Os parâmetros *mismatch* estimados foram theta 0 (θ_0) = 1,388, theta 1 (θ_1) = 6,404 e tau (τ) = 1,970. Utilizo-se uma correção da taxa de mutação média estimada para a região controle de peixes teleósteos ($3,6 \times 10^{-8}$ mutações / sítio / ano) (Donaldson & Wilson, 1999). A correção foi baseada no fato de que o tau é calculado através de uma estimativa da taxa de mutação para todo o haplótipo. Como trabalhamos com a técnica de PCR-RFLP e obtivemos uma média de 5 pb de reconhecimento de sítio de restrição, foi necessária a multiplicação desse número por 23, que corresponde ao número de sítios de restrição polimórficos utilizados na montagem dos haplótipos. Sendo assim, obtivemos 115 nucleotídeos cuja mutação poderia ser responsável

pela mudança do haplótipo. Então, a taxa de mutação corrigida ficou em $4,14 \times 10^{-6}$ mutações / haplótipo / ano.

O tempo de expansão foi calculado em 238 mil anos, baseado na fórmula $T = \tau / 2\mu$, onde μ é a taxa de mutação.

Outros fatores que sugerem a expansão populacional são: a distribuição dos haplótipos nas amostras (um haplótipo mais freqüente e vários raros, evidenciado na tabela 8), e as redes de haplótipos (figuras 30, 31 e 32) que mostram que o haplótipo mais freqüente originou os haplótipos restritos.

Tabela 11: Valores dos testes de neutralidade para cada amostra analisada. No teste Fs, a significância de 5% é obtida para valores de P inferiores a 0,02.

	Ewens-Watterson (F) -	Tajima (D) -	Fu (Fs) -
	P(Watterson)	P(D simul < D obs)	P(Fs sim <= Fs obs)
CAR	0,3103 (P = 0,9805)	-1,1610 (P = 0,1090)	-3,7647 (P = 0,0150)
COL	0,2223 (P = 0,9999)	-0,9677 (P = 0,1780)	-8,6783 (P = 0,0000)
ALA	0,3254 (P = 1,0000)	-1,9297 (P = 0,0060)	-5,0888 (P = 0,0000)
IGA	0,2325 (P = 0,9505)	-0,6719 (P = 0,2850)	-3,1922 (P = 0,0300)
PED	0,1572 (P = 0,8911)	-0,3533 (P = 0,3940)	-4,1370 (P = 0,0050)
GLO	0,5000 (P = 0,0710)	1,4636 (P = 0,9780)	1,0959 (P = 0,6470)
JAB	0,1484 (P = 0,9863)	-1,0912 (P = 0,1440)	-6,0513 (P = 0,0000)
PIR	0,1111 (P = 0,6808)	-1,0080 (P = 0,1590)	-6,4679 (P = 0,0000)
PIN	0,4400 (P = 1,0000)	-1,1455 (P = 0,0720)	0,9518 (P = 0,6560)

CAR = Cardoso, COL = Colômbia, ALA = Conceição das Alagoas, IGA = Igarapava, PED = Pedregulho, GLO = São João Batista do Glória, JAB = Jaborandi, PIR = Pirassununga e PIN = Espírito Santo do Pinhal.

Figura 34: Distribuição *mismatch* dos haplótipos encontrados em cada amostra.

Figura 35: Distribuição *mismatch* dos haplótipos encontrados em cada amostra e no total.

Na análise entre amostras, foi calculada a divergência (δ), cujos valores estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Valores de divergência (δ) entre as amostras de *P. lineatus*.

	CAR	COL	ALA	IGA	PED	GLO	JAB	PIR
COL	-0.000036							
ALA	-0.001561	-0.001484						
IGA	0.000538	-0.001191	0.000231					
PED	-0.000311	-0.001868	-0.000173	0.000445				
GLO	0.005230	0.001383	0.002102	0.001496	0.004468			
JAB	0.012455	0.008034	0.004850	0.006728	0.005986	0.009705		
PIR	0.002403	0.000096	0.001219	0.000355	-0.001282	0.002555	-0.000240	
PIN	-0.001689	-0.002502	0.000722	0.000590	-0.001599	0.002283	0.008917	0.001817

CAR = Cardoso, COL = Colômbia, ALA = Conceição das Alagoas, IGA = Igarapava, PED = Pedregulho, GLO = São João Batista do Glória, JAB = Jaborandi, PIR = Pirassununga e PIN = Espírito Santo do Pinhal.

Os valores de divergência (δ) mostram diferenciação entre as amostras e variaram de 0,0112 a 0,0334 (média de 0,019705 +/- 0,006626). Estes valores são considerados de baixos a moderados, e são maiores entre a amostra de Jaborandi e as outras (média de 3,10% contra 1,74% entre as restantes).

Na tabela 13 são apresentados os resultados de *Fst* entre pares de amostras.

Os valores encontrados de *Fst* entre as amostras mostraram que há diferença significativa entre a amostra de Jaborandi e as demais. Valores significantes foram também encontrados entre a amostra de São João Batista do Glória e as demais (exceto Pirassununga). Esta amostra encontra-se fora do limite populacional delimitado por Toledo-Filho *et al.* (1987). A análise dos pares Pedregulho/Conceição das Alagoas e Pedregulho/ Pirassununga, também revelou diferenciação significativa.

Tabela 13: Valores de *Fst* entre pares de amostras de *P. lineatus*.

	CAR	COL	ALA	IGA	PED	GLO	JAB	PIR
COL	0,013 ⁻							
ALA	0,012 ⁻	0,009 ⁻						
IGA	0,005 ⁻	-0,005 ⁻	0,048 ⁻					
PED	0,014 ⁻	0,028 ⁻	0,102 ⁺	0,014 ⁻				
GLO	0,124 ⁺	0,066 ⁺	0,221 ⁺	0,092 ⁺	0,256 ⁺			
JAB	0,413 ⁺	0,414 ⁺	0,533 ⁺	0,447 ⁺	0,477 ⁺	0,533 ⁺		
PIR	0,034 ⁻	-0,005 ⁻	0,034 ⁻	0,022 ⁻	0,065 ⁺	0,007 ⁻	0,424 ⁺	
PIN	0,043 ⁻	-0,013 ⁻	0,048 ⁻	0,029 ⁻	0,099 ⁻	0,222 ⁺	0,452 ⁺	0,037 ⁻

+ diferença significativa - diferença não significativa

* n° de permutações = 1023, e $\alpha = 0,05$.

Da mesma forma, tanto a distribuição de Monte Carlo ($P = 0.000$) quanto o teste exato de diferenciação ($P = 0,007 \pm 0,007$) revelaram que há heterogeneidade significativa entre as frequências haplotípicas. Ambos os testes também foram utilizados para averiguar a heterogeneidade entre os pares de amostras, os resultados estão apresentados nas tabelas 14 e 15.

Tabela 14: Significância dos valores de $P (X^2_{sim} > X^2_{obs})$ obtidos na análise de heterogeneidade haplotípica entre os pares de amostras. ($P < 0,05$ acima da diagonal, e $P < 0,01$ abaixo da diagonal). Em vermelho estão os resultados que divergem, dependendo do valor de α adotado.

	CAR	COL	ALA	IGA	PED	GLO	JAB	PIR	PIN
CAR		-	-	+	-	+	+	+	-
COL	-		-	-	-	-	+	-	-
ALA	-	-		-	-	+	+	-	-
IGA	-	-	-		-	-	+	+	-
PED	-	-	-	-		+	+	-	-
GLO	+	-	-	-	-		+	-	+
JAB	+	+	+	+	+	+		+	+
PIR	+	-	-	-	-	-	+		-
PIN	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ significante

- não significante

Tabela 15: Resultado do teste exato de diferenciação entre os pares de amostras. Valores significantes em vermelho e não significantes em preto. O α adotado foi 0,05.

	CAR	COL	ALA	IGA	PED	GLO	JAB	PIR
COL	0.04413+- 0.0043							
ALA	0.34072+- 0.0121	0.80047+- 0.0197						
IGA	0.02110+- 0.0040	0.10182+- 0.0115	0.32306+- 0.0142					
PED	0.11937+- 0.0112	0.12577+- 0.0137	0.40553+- 0.0095	0.26672+- 0.0096				
GLO	0.02003+- 0.0023	0.26021+- 0.0231	0.04841+- 0.0034	0.42226+- 0.0119	0.02571+- 0.0032			
JAB	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00018+- 0.0002	0.00000+- 0.0000	0.00376+- 0.0009	0.00077+- 0.0004		
PIR	0.00309+- 0.0010	0.14030+- 0.0062	0.52917+- 0.0100	0.06585+- 0.0056	0.37377+- 0.0090	0.44993+- 0.0122	0.00000+- 0.0000	
PIN	0.44090+- 0.0167	0.81824+- 0.0186	0.78631+- 0.0085	0.53404+- 0.0099	0.71658+- 0.0050	0.05797+- 0.0028	0.03193+- 0.0036	0.63901+- 0.0088

CAR = Cardoso, COL = Colômbia, ALA = Conceição das Alagoas, IGA = Igarapava, PED = Pedregulho, GLO = São João Batista do Glória, JAB = Jaborandi, PIR = Pirassununga e PIN = Espírito Santo do Pinhal.

Novamente, observam-se diferenças significativas entre a amostra de Jaborandi e as outras. A distribuição de Monte Carlo e o teste exato de diferenciação mostram também outros valores significantes, principalmente em relação às amostras de Cardoso e São João Batista do Glória. Estas duas amostras estão fora da área populacional delimitada.

Através da distância geográfica fluvial e da distância genética de Nei, ou divergência (δ) (anexo 5), foram construídos gráficos de pontos (figura 36) para tentar averiguar a existência de uma correlação entre as distâncias (o que evidenciaria um padrão de isolamento pela distância). Os dados dos gráficos, aliados ao teste de Mantel (coeficiente de correlação = -0,22 e $P = 0,76$, e coeficiente de regressão = 0), mostram que não há correlação entre as distâncias. Resultado similar foi obtido no gráfico de pontos da distância geográfica fluvial e do F_{st} (anexo 6) (coeficiente de correlação = -0,22) (figura 37).

Em ambos os casos, o gráfico geral foi modificado para apresentar os resultados excluindo as amostras que estão fora da área delimitada por Toledo-Filho *et al.* (1987) (Cardoso e São João Batista do Glória, no Rio Grande, e Espírito Santo do Pinhal, no Rio Mogi-Guaçu), assim como para evidenciar a comparação da amostra de Jaborandi com as outras. A comparação da amostra de Jaborandi com as outras possui um coeficiente de correlação de 0,12 (pelo F_{st}), essas comparações representam os pontos mais à direita dos gráficos.

Figura 36: Relação entre a distância genética (δ) e a distância geográfica (em Km) entre as amostras estudadas.

Figura 37: Relação entre a distância genética (*Fst*) e a distância geográfica (Km) entre as amostras estudadas.

Com os valores de divergência genética (δ), de *Fst* e de *net nucleotide sequence divergence* (d_A) (tabela 16), foram construídos filogramas utilizando o algoritmo Neighbor-Joining. Os agrupamentos são discordantes, o que evidencia a dificuldade em se estabelecer uma relação entre as amostras. Porém, a amostra de Jaborandi apresenta maior diferenciação em relação às outras (figura 38).

Tabela 16: Valores obtidos na análise *net nucleotide sequence divergence* (d_A).

	CAR	COL	ALA	IGA	PED	GLO	JAB	PIR
COL	0.03041							
ALA	0.03732	0.06461						
IGA	0.00681	-0.01204	0.12010					
PED	0.01635	0.10054	0.16084	0.03953				
GLO	0.25424	0.24439	0.22222	0.24199	0.49495			
JAB	1.84811	1.98912	2.12179	1.99440	2.21970	2.11806		
PIR	0.06673	-0.01209	0.09100	0.05614	0.18657	0.06536	1.97508	
PIN	0.03202	0.00837	-0.03077	0.07194	0.23636	0.22222	2.10833	0.13203

CAR = Cardoso, COL = Colômbia, ALA = Conceição das Alagoas, IGA = Igarapava, PED = Pedregulho, GLO = São João Batista do Glória, JAB = Jaborandi, PIR = Pirassununga e PIN = Espírito Santo do Pinhal.

Na análise de estrutura populacional empregando a análise de variância molecular (AMOVA), foi testada inicialmente a hipótese da presença de três grupos geneticamente estruturados, um formado pelas amostras do Rio Grande (CAR, COL, ALA, IGA, PED e GLO), outro pela amostra do Rio Pardo (JAB) e outro formado pelas amostras do Rio Mogi-Guaçu (PIR e PIN).

Os dados revelaram que a maior variabilidade é encontrada dentro das amostras (69,93%), seguida da variabilidade entre grupos (27,86%) e entre as amostras dentro dos grupos (2,21%) (tabela 17). Podemos observar que todos os valores são significantes ($P < 0,05$).

Tabela 17: Resultados obtidos na análise de variância molecular (AMOVA) utilizando três agrupamentos de acordo com os três rios estudados.

Componentes da variância	g.l.	Variância	% do total	P [*]	ϕ
Entre grupos	2	0,437	27,86	0,0270	$\phi_{CT} = 0,2786$
Entre amostras dentro dos grupos	6	0,034	2,21	0,0000	$\phi_{SC} = 0,0306$
Dentro das amostras	145	1,096	69,93	0,0000	$\phi_{ST} = 0,3007$

* n° de permutações = 16002, e $\alpha = 0,05$.

Foi realizada, também, outra análise de variância molecular excluindo a amostra de Jaborandi, pois os resultados de diferenciação entre os pares de amostras evidenciaram uma acentuada diferenciação dessa amostra em relação às outras, e valores não significativos (na maioria dos casos) entre as outras amostras.

Sendo assim, os resultados apresentados na tabela 18 referem-se a dois agrupamentos, um formado pelas amostras do Rio Grande (CAR, COL, ALA, IGA, PED e GLO) e outro formado pelas amostras do Rio Mogi-Guaçu (PIR e PIN).

Os resultados evidenciam que não há diferenciação significativa entre os rios Grande e Mogi-Guaçu (-0,75 % e $P = 0,61$). A maior variabilidade continua sendo aquela encontrada dentro das amostras (97,49% e $P = 0,0137$) e a variabilidade entre amostras dentro dos grupos corresponde a uma porcentagem baixa (3,26%), porém significativa ($P = 0,0133$).

Desta forma, foi evidenciado que a variação observada entre os três rios é devida apenas à amostra do Rio Pardo (Jaborandi).

Tabela 18: Resultados obtidos na análise de variância molecular (AMOVA) sem a presença da amostra do Rio Pardo (Jaborandi, SP).

Componentes da variância	g.l.	Variância	% do total	P *	ϕ
Entre grupos	1	-0,008	-0,75	0,6138	$\phi_{CT} = -0,0075$
Entre amostras dentro dos grupos	6	0,035	3,26	0,0133	$\phi_{SC} = 0,0324$
Dentro das amostras	130	1,073	97,49	0,0137	$\phi_{ST} = 0,0251$

* n^o de permutações = 16002, e $\alpha = 0,05$.

Neighbor-Joining (δ)

Neighbor-Joining (F_{st})

Neighbor-Joining (d_A)

Figura 38: Filograma, utilizando o algoritmo Neighbor-Joining, mostrando a relação entre as amostras (baseado na divergência – δ , no F_{st} e na “net nucleotide sequence divergence” - d_A).

5. Discussão

5.1 Padrões de restrição do fragmento ND2-CO1 do mtDNA

Na análise da sequência parcial dos genes mitocondriais ND2 e CO1, foram utilizadas três amostras pertencentes a três rios distintos (Rio Grande, Rio Pardo e Rio Mogi-Guaçu). Essas amostras foram escolhidas porque análises preliminares com a região *D-loop* evidenciaram diferenciação entre a amostra do rio Pardo e as outras duas.

Utilizamos dez enzimas de restrição, sendo que apenas quatro (*Bam*HI, *Hae*III, *Hin*fI e *Pvu*II) revelaram polimorfismos nesta região (tabela 2).

Foram encontrados cinco haplótipos para esta região do mtDNA, sendo o haplótipo I o mais freqüente em todas as amostras analisadas (tabela 3). As freqüências relativas encontradas para o haplótipo I foram de 92,3% na amostra de Pirassununga (Rio Mogi-Guaçu), 91,7% na amostra de Jaborandi (Rio Pardo) e 80,0% na amostra de Conceição das Alagoas (Rio Grande).

A presença de poucos haplótipos, sendo um deles amplamente distribuído e em alta freqüência, evidencia que os genes ND2 e CO1 do DNA mitocondrial possuem seqüências bastante conservadas em *P. lineatus*.

Os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica encontrados (tabela 4) são baixos quanto comparados com os dados obtidos para a região controle (*D-loop*) (tabela 10).

Devido a esta conservação, não foi possível a averiguação de diferenciação entre as amostras, o que é verificado nos valores encontrados de divergência nucleotídica (essencialmente zero) (tabela 5), assim como na distribuição de Monte Carlo.

Os resultados obtidos através da análise de restrição da região entre os genes ND2 e CO1 mostram pouca variabilidade, o que indica que a técnica de PCR-RFLP de regiões conservadas do mtDNA seja pouco informativa, não sendo adequada para identificar a existência de estruturação populacional. Neste sentido, devemos observar que a literatura indica que regiões mais variáveis são mais informativas para estudos de divergência recente. Por esse motivo, decidiu-se aumentar a quantidade de dados obtidos para a região *D-loop* do mtDNA, assim como sua forma de análise, já que essa é uma região mais variável.

5.2 Padrões de restrição da região controle (*D-loop*) do mtDNA

A análise da região *D-loop* do DNA mitocondrial foi realizada em nove amostras provenientes dos rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu.

Das 15 enzimas de restrição utilizadas, três (*Pst*I, *Pvu*II e *Stu*I) não possuem sítios de restrição no fragmento de aproximadamente 1.370 pb da região *D-loop*. As enzimas *Cla*I e *Sca*I possuem sítio de restrição, mas não evidenciaram polimorfismo.

Observou-se uma variação de tamanho em um indivíduo da amostra de Colômbia. Dados da literatura apontam para variações de tamanho do mtDNA de dezenas de pares de base a 2,0 Kb (Passoni, 1998), sendo a região *D-loop* a grande responsável pela maior parte das inserções, principalmente de seqüências repetidas *in tandem* (Moritz & Brown, 1986).

Com as dez enzimas utilizadas inicialmente foi possível perceber uma variação de tamanho de cerca de 250 pb adicionais (figura 12), sendo a proporção de ocorrência na amostra de 3,3%. Em lagartos do gênero *Cnemidophorus*, Densmore *et al.* (1985) relataram proporções de 20% para *C. tigris* e 25% para *C. tessellatus*, sendo que estes valores estão dentro do esperado segundo os dados da literatura. Este indivíduo não foi incluído nas análises, pois a homologia dos fragmentos de restrição gerados seria de difícil averiguação.

A quantidade de haplótipos por amostra encontrada foi de 10 em Cardoso (CAR), 16 em Colômbia (COL), sete em Conceição das Alagoas (ALA), 10 em Igarapava (IGA), oito em Pedregulho (PED), dois em São João Batista do Glória (GLO), 11 em Jaborandi (JAB), 12 em Pirassununga (PIR) e três em Espírito Santo do Pinhal (PIN) (tabelas 6 e 8).

Do total de haplótipos obtidos (55), 13 são compartilhados entre amostras. Os haplótipos mais amplamente compartilhados são o haplótipo 1, que é encontrado em todas as amostras (exceto Jaborandi), e constitui o haplótipo mais freqüente; e o haplótipo 2, que é encontrado na maioria das amostras, com exceção de Colômbia, São João Batista do Glória, Jaborandi e Espírito Santo do Pinhal (tabela 8 e figura 28).

Jaborandi só compartilha haplótipos com Cardoso (H9 e H10). Cardoso também compartilha haplótipos com Colômbia (H3 e H8). Colômbia compartilha um haplótipo com Igarapava (H20) e três com Pirassununga (H13, H14 e H22), sendo que o haplótipo 22 também é compartilhado com Conceição das Alagoas. Igarapava também

compartilha dois haplótipos com Pedregulho (H31 e H33) e um com São João Batista do Glória e Pirassununga (H32) (tabela 8 e figura 29).

Uma situação interessante foi verificada com relação à amostra do Rio Pardo (Jaborandi), que só compartilha haplótipos com Cardoso. Estes haplótipos não foram encontrados em Colômbia (amostra localizada entre Jaborandi e Cardoso) (figura 29).

Como dito, a amostra de Jaborandi não compartilha haplótipos com as demais amostras, incluindo Pirassununga (Rio Mogi-Guaçu) que compartilha haplótipos tanto com Colômbia quanto com Igarapava (ambas do Rio Grande). Esse fato, aliado aos valores significantes de *F_{st}*, Monte Carlo e teste exato (tabelas 13, 14 e 15), sugere que a amostra do Rio Pardo seja proveniente de uma sub-população diferente daquela que engloba os trechos estudados dos rios Grande e Mogi-Guaçu, ou que tenha se diferenciado desta há muito tempo. Estas hipóteses são reforçadas pelo teste de AMOVA (tabelas 17 e 18) e pelo filograma que utiliza a distância d_A (figura 38).

Excluindo, então, a amostra de Jaborandi, a distribuição dos haplótipos compartilhados condiz em parte com a distribuição geográfica das amostras, sendo que, no padrão geral, os haplótipos são compartilhados entre amostras adjacentes (figura 29).

As exceções são os haplótipos 1, 2 e 32 que são encontrados internamente na rede de haplótipos (figura 30), o que sugere que estes haplótipos possivelmente estavam presentes na população natural antes da construção das barragens.

Outra exceção é o haplótipo 20, que não apareceu em Conceição das Alagoas (localizada entre Colômbia e Igarapava), porém este resultado pode ser devido ao pequeno número amostral de Conceição das Alagoas ($n = 13$), já que este haplótipo é raro.

Analisando as amostras isoladamente (figuras 31 e 32), pôde-se notar que o haplótipo 1 (além de mais freqüente e amplamente distribuído) seria o haplótipo ancestral, a partir do qual se originaram todos os outros haplótipos. Segundo Templeton *et al.* (1995), haplótipos de distribuição geográfica ampla e que estão localizados internamente na rede de haplótipos, seriam haplótipos de origem mais antiga, enquanto que haplótipos restritos e que estão localizados na extremidade da rede, teriam uma origem mais recente. Na amostra de Jaborandi não encontramos o haplótipo 1, porém, o haplótipo 41, que é o mais freqüente e aparece como ancestral, poderia ter se originado a partir do haplótipo 1 (figura 30).

Quanto à divergência de seqüências de nucleotídeos entre pares de haplótipos (d), os valores estimados variaram 0,47% a 7,99% (tabela 9). Os valores de d

encontrados estão dentro do esperado para peixes de água doce da mesma espécie, que variam, aproximadamente, de 0,1% a 10,0%, sendo maiores que os esperados para espécies anádromas (5,0%), catádromas (2,0%) e marinhas (4,4%). Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de d encontrados dentro e entre amostras.

Os valores de d foram utilizados na construção de dois filogramas (figura 33). Pelo algoritmo Fitch-Margoliash, foi possível a identificação de um clado composto pelos haplótipos de Jaborandi (Rio Pardo - H9, H10, H39 a H47), porém, os outros clados não apresentaram relação com a distribuição geográfica, encontrando-se misturados. Pelo algoritmo Neighbor-Joining, encontramos também uma mistura de haplótipos de localidades distintas, inclusive observamos que dois haplótipos restritos a Jaborandi (H44 e H45) não estão agrupados com os outros desta localidade, e sim em outros clados que envolvem amostras de diferentes localidades. Vale ressaltar que o haplótipo 1 é encontrado na posição basal em ambas as abordagens.

Estudos indicam que, em populações que divergiram recentemente, a rede de haplótipos pode ser mais informativa do que a reconstrução filogenética. No caso aqui estudado, a rede de haplótipos também mostrou uma relação complexa, onde encontramos indícios de relação com a distribuição geográfica somente para Jaborandi. Desse modo, os dados devem ser considerados com cautela (figura 30).

Quanto aos índices de diversidade, foram obtidos valores de diversidade haplotípica (h) que variam de altos a moderados. Os valores de h possuem uma média de 0,7872 +/- 0,00178, sendo os maiores valores encontrados em Pirassununga, Jaborandi e Pedregulho e o menor em São João Batista do Glória (tabela 10), isso pode ser explicado tendo em vista que o cálculo de h leva em conta a frequência com que os haplótipos ocorrem e não o número absoluto de haplótipos. Vale ressaltar que as localidades Pirassununga e Jaborandi pertencem a uma região onde o impacto ambiental foi menor, pois ainda encontramos trechos livres de rio e lagoas marginais (essenciais para a reprodução natural do curimatá).

Graves (1998) relata que os valores médios de h e π em populações de peixes marinhos de distribuição descontínua variaram, respectivamente, de 0,58 a 0,96 e de 0,1 a 2,48%, enquanto que em espécies com distribuição contínua os valores de π variaram de 0,15 a 0,59%. Moysés & Almeida-Toledo (2002) relataram valores de h variando de 0,166 a 0,9 e valores de π entre 0,09 e 0,41% em espécies do gênero *Astyanax*. Os

valores acima foram utilizados nas comparações com os índices obtidos de diversidade haplotípica e nucleotídica.

Os valores de diversidade nucleotídica (π) estimados para as amostras analisadas também são altos e estão dentro do esperado para populações da mesma espécie. A média encontrada foi de 1,77%, sendo os maiores valores encontrados em Jaborandi, Pirassununga e Pedregulho e o menor em São João Batista do Glória (tabela 10). O valor de π expressa o grau de divergência entre os haplótipos. Na amostra de Jaborandi, encontramos um valor de π de 3,18%, que é acima do relatado para populações de peixes marinhos, e bem acima dos valores encontrados para o gênero de água-doce *Astyanax*.

A redução e/ou perda da variabilidade genética estão associadas à ocorrência recente de gargalos evolutivos. Situações de cultivo inadequado e alterações ambientais podem gerar tais efeitos.

Os resultados aqui apresentados não indicam que a população de *P. lineatus* da bacia do Rio Grande esteja sofrendo (ou tenha sofrido recentemente) o efeito esperado após um período de gargalo, ou seja, os valores observados de diversidade são condizentes com os encontrados em populações naturais com um tamanho efetivo alto.

Análises mais detalhadas evidenciaram que quase todas as amostras passaram por um período de expansão populacional. Tanto os testes de neutralidade (tabela 11) quanto a forma das curvas da distribuição *mismatch* (figuras 34 e 35) evidenciaram tal expansão. Esta expansão pode ser uma recuperação populacional de um gargalo anterior.

Outros fatores que confirmam a expansão populacional são: a distribuição dos haplótipos nas amostras (um haplótipo mais freqüente e vários raros, evidenciado na tabela 8), e as redes de haplótipos (figuras 30, 31 e 32) que mostram que o haplótipo mais freqüente originou os haplótipos restritos.

O tempo de expansão foi calculado para o conjunto total de amostras, baseado na fórmula $T = \tau / 2\mu$, onde μ é a taxa de mutação. Os valores obtidos de theta 0 (θ_0), theta 1 (θ_1) e tau (τ) foram, respectivamente, 1,388, 6,404 e 1,970. A data em que ocorreu a expansão foi estimada em 238 mil anos, e corresponde ao Pleistoceno Médio (de 126 a 781 mil anos).

Durante este período a América do Sul passou por diversas mudanças climáticas que estão associadas a mudanças significativas na flora e fauna (Campbell-Jr, 1982). Weitzman & Weitzman (1982), analisando a biogeografia e a diversificação evolutiva

de peixes de água doce Neotropicais, postularam que as mudanças climáticas e geográficas ocorridas no Plioceno e Pleistoceno teriam sido mais responsáveis por uma evolução no nível de espécie do que no nível de grandes gêneros e também de famílias.

Dados mais específicos sobre as mudanças climáticas e geográficas na região da bacia do Rio Grande não foram encontrados na literatura pesquisada, porém a hipótese proposta, baseada em trabalhos semelhantes obtidos para a região Amazônica (Campbell-Jr, 1982), seria a de que a expansão populacional observada estaria relacionada a uma expansão do hábitat do curimbatá.

Os valores de divergência (δ) (tabela 12) mostram diferenciação entre as amostras e variaram de 1,12% a 3,34% (com média de 1,97% $\pm$ 0,66%). Os maiores valores foram encontrados entre a amostra do Rio Pardo e as outras (média de 3,10% contra 1,74% das outras amostras entre si). Os valores de δ encontrados estão dentro do relatado em dados da literatura, que mostram uma variação de 0,1% (Wirgin *et al.*, 1989) a 10% (Bermingham & Avise, 1986) de divergência para comparações intra-específicas, sendo que espécies com maior mobilidade apresentam valores menores de divergência.

A heterogeneidade das frequências haplotípicas entre as amostras foi averiguada através da distribuição de Monte Carlo, que se revelou significativa ($P = 0.0000$), e também da análise do teste exato de diferenciação ($P = 0,007 \pm 0,007$).

Análises entre pares de amostras (F_{st} , Monte Carlo e teste exato) revelam que há homogeneidade nas frequências haplotípicas entre a maioria das amostras. Porém, em todas as análises, a amostra de Jaborandi é significantemente diferente de todas as outras. A amostra de São João Batista do Glória também se mostrou significantemente diferente de várias outras (especialmente na análise de F_{st} – tabela 13). Esta amostra está fora da área delimitada por Toledo-Filho *et al.* (1987), porém este resultado pode ser um viés, já que esta amostra possui um número amostral pequeno ($n = 10$), com a presença de dois haplótipos em igual frequência. Outras diferenças significativas são apresentadas a seguir.

	Car/Col	Car/Iga	Car/Pir	Iga/Pir	Ped/Pir	Ala/Ped
<i>Fst</i>	-	-	-	-	+	+
Monte ($\alpha = 5\%$)	-	+	+	+	-	-
Monte ($\alpha = 1\%$)	-	-	+	-	-	-
Teste Exato	+	+	+	-	-	-

Car = Cardoso; Col = Colômbia; Iga = Igarapava; Pir = Pirassununga;

Ped = Pedregulho; e Ala = Conceição das Alagoas.

Apenas os pares Cardoso/Igarapava e Cardoso/Pirassununga mostraram-se significativos em mais de um teste. Cardoso, assim como S.J.B. do Glória, também está fora da área delimitada por Toledo-Filho *et al.* (1987).

Verifica-se que mesmo as barragens sendo uma barreira ao fluxo migratório, podem ocorrer mistura entre localidades adjacentes pela abertura dos vertedouros na época das cheias (quando as populações locais encontram o estímulo para a migração reprodutiva). Durante os esforços de coleta obtivemos, de diversas fontes e em diferentes locais, informações que confirmam o exposto acima.

Ward *et al.* (1992) concluíram, com base em dados da literatura, que a mobilidade é um fator importante em se tratando da estrutura genético-populacional, sendo que espécies que apresentam grande mobilidade exibem níveis de estruturação populacional menos complexos.

Segundo Avise (1994), outros fatores, além da mobilidade, que podem influenciar o grau de fluxo gênico e a estrutura populacional de uma espécie são: a presença de barreiras físicas ou ecológicas; características comportamentais (como filopatria); história de vida do organismo; padrões de dispersão e fluxo gênico ligados ao sexo (no caso de marcadores genéticos com transmissão uniparental); influência diferencial da seleção natural em locos nucleares e mitocondriais; eventos demográficos que rompem o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética; e a distância geográfica entre as sub-populações.

No presente estudo, foram utilizados apenas marcadores mitocondriais, o que reflete a estrutura populacional das fêmeas. Atualmente é crescente o uso combinado de marcadores mitocondriais e nucleares tanto em estudos de estruturação populacional quanto em estudos de relações filogenéticas. Em alguns casos, foi possível observar padrões de estruturação relacionados ao sexo (Nyakaana & Arctander, 1999; Sanetra & Crozier, 2003). O emprego de marcadores de microssatélites nas amostras aqui estudadas pode elucidar se a estrutura populacional observada com RFLP da região *D-*

loop reflete ou não uma estruturação relacionada ao sexo, embora não haja relatos na literatura de migração diferencial entre machos e fêmeas.

Quanto à mobilidade, o curimatá é um peixe migrador que, na região da bacia do Rio Grande, apresenta distribuição contínua e percorria uma distância fluvial de aproximadamente 700 km, tendo, assim, grande amplitude migratória. Estudos de marcação e recaptura nessa região (Godoy, 1975) foram utilizados para realizar a delimitação populacional do curimatá. Tal delimitação identificou a presença de barreiras físicas, passadas (cachoeiras) ou atuais (barragens) (Toledo-Filho, 1981).

As barragens construídas na região da bacia do Rio Grande romperam o equilíbrio entre fluxo e deriva, mesmo naquelas em que há escada para a subida de peixes, pois, apesar de escassos, estudos que enfocam a eficiência das escadas brasileiras mostraram vários aspectos geradores de problemas (ver item 1.4.1 da Introdução).

Vários modelos foram propostos para descrever a estrutura de populações subdivididas (com base no padrão de migração entre elas). São eles: modelo continente-ilha, onde o fluxo unidirecional ocorre de uma população de tamanho maior para subpopulações menores; modelo de ilha, onde há fluxo em todos os sentidos entre populações de mesmo tamanho; modelo de alpondras (*stepping-stone*), onde a migração ocorre entre populações imediatamente vizinhas; e isolamento por distância, onde, em uma população de distribuição contínua, o fluxo gênico diminui à medida que a distância aumenta.

No presente estudo, decidimos testar se *P. lineatus* da bacia do Rio Grande apresenta estruturação relativa ao isolamento por distância, já que foram utilizadas amostras de localidades que se encontram fora da área delimitada por Toledo-Filho *et al.* (1987). Sendo assim, construímos um gráfico de pontos da distância geográfica fluvial pela distância genética de Nei (figura 36), assim como pelo *Fst* (figura 37).

Os resultados não confirmaram uma estruturação baseada no isolamento por distância. Observamos apenas que os maiores valores de divergência são observados entre a amostra de Jaborandi e as outras, porém, mesmo para este grupo de dados, não encontramos uma correlação significativa entre as distâncias (coeficiente de correlação de 0,12).

Para explicar os resultados genéticos devemos sempre pensar na ecologia das espécies. O curimatá é um peixe conhecido pelas grandes migrações reprodutivas que realiza, assim como pela capacidade em saltar grandes obstáculos (tanto na bacia do Rio

Grande quanto no Pantanal e em Foz do Iguaçu). Sendo assim, não é de surpreender que esta espécie não apresente um padrão de isolamento por distância.

Os valores de δ , F_{st} e d_A foram utilizados na construção de filogramas, utilizando o algoritmo Neighbor-Joining. As árvores encontradas (figura 38) são discordantes, o que evidencia a dificuldade de se estabelecer relação entre as amostras. Porém, em todos os casos, a amostra de Jaborandi apresenta maior diferenciação em relação às outras. No filograma utilizando d_A , obtivemos uma separação entre a amostra de Jaborandi e as outras (que apresentam pequena diferença entre si). Esta representação é condizente com os dados obtidos, segundo os quais a amostra de Jaborandi apresenta uma diferença significativa em relação às outras (tabelas 13, 14, 15, 16, 17 e 18).

Para tentar averiguar onde está localizada a maior parcela da variação observada em *P. lineatus* da bacia do Rio Grande, utilizamos a análise de variância molecular (AMOVA). Testamos inicialmente a hipótese da presença de três grupos geneticamente estruturados, um formado pelas amostras do Rio Grande, outro pela amostra do Rio Pardo e outro pelas amostras do Rio Mogi-Guaçu. Os grupos testados são artificiais, já que são definidos pelo próprio pesquisador.

Obtivemos valores significantes em todos os níveis (ϕ_{CT} , ϕ_{SC} e ϕ_{ST}), sendo que a maior variabilidade é encontrada dentro das amostras, seguida da variabilidade entre grupos e entre as amostras dentro dos grupos (tabela 17).

Foi realizada, também, uma outra análise de variância molecular, excluindo a amostra de Jaborandi, com o objetivo de averiguar se a diferença entre grupos encontrada era devida a esta amostra, já que os resultados de diferenciação entre os pares de amostras evidenciaram uma acentuada diferenciação entre a amostra de Jaborandi e as outras, e valores não significativos (na maioria dos casos) entre as outras amostras.

Desta forma, foram analisados dois agrupamentos, sendo um formado pelas amostras do Rio Grande e o outro formado pelas amostras do Rio Mogi-Guaçu.

Os resultados evidenciam que não há diferenciação significativa entre os Rios Grande e Mogi-Guaçu (-0,75% e $P = 0,61$). A maior variabilidade continua sendo aquela encontrada dentro das amostras e a variabilidade entre amostras dentro dos grupos corresponde a uma porcentagem baixa, porém significativa (tabela 18).

Desta forma, foi evidenciado que a variação observada entre os três rios era devida apenas à amostra do Rio Pardo (Jaborandi). Sendo assim, foi possível detectar a presença de duas sub populações, uma representada pela amostra de Jaborandi (Rio

Pardo) e outra representada pelas outras amostras estudadas (rios Grande e Mogi-Guaçu).

Ittig *et al.* (2002) discutindo dados de Chiappero *et al.* (2002) sobre *Calomys musculinus*, semelhantes ao encontrado no presente trabalho (maior variabilidade dentro das populações), propuseram que tal fato poderia ser explicado por uma expansão relativamente recente do hábitat de *C. musculinus*, com níveis de fluxo gênico baixos a moderados.

Resultados obtidos por Revaldaves *et al.* (1997) na região superior do Rio Paraná, utilizando eletroforese de isozimas, e também por Sivassundar *et al.* (2001) na região da bacia do Paraná, utilizando o seqüenciamento da região *D-loop*, indicaram que as populações de *P. lineatus* constituem uma única população panmítica, com uma alta variabilidade nos estoques selvagens.

Os resultados encontrados no presente estudo indicam que, apesar de a relação entre as divergências haplotípicas e as localidades ser controversa, há alguma estruturação populacional em *Prochilodus lineatus* da bacia do Rio Grande, e que a detecção de 55 haplótipos diferentes em apenas nove amostras, é um indicativo da utilidade da técnica de RFLP da região *D-loop* do mtDNA como um marcador para investigar a estrutura populacional do curimatá.

O objetivo do presente estudo, ou seja, avaliar a influência das barragens na população de *Prochilodus lineatus* da bacia do Rio Grande, foi cumprido, pois, além dos resultados acima discutidos, pôde-se constatar a redução de um estoque entre as barragens de Estreito e Peixoto (no Rio Grande), onde diversos pescadores de diferentes cidades comunicaram que a pesca do curimatá da região cessou aproximadamente dois anos após o término do programa de repovoamento realizado por Furnas.

Paiva *et al.* (2002) relatam que a presença de peixes de piracema (incluindo o *Prochilodus lineatus*) nos reservatórios do Rio Grande indica que há condições efetivas de reprodução, apesar da impossibilidade de migrações a montante no curso principal do rio devido à presença das barragens. Porém, os autores acima citados fazem uma observação sobre os programas de repovoamento, realizados pelas empresas concessionárias da geração de energia elétrica, que poderiam ser responsáveis pela manutenção das populações em determinados trechos do rio. Este parece ser o caso do estoque localizado entre as barragens de Estreito e Peixoto.

Em conclusão, pode-se dizer que as barragens localizadas no trecho estudado no presente trabalho, embora impeçam o fluxo migratório, não geraram diferenças significativas a curto prazo entre as amostras estudadas.

Quanto aos programas de repovoamento, é importante destacar que existe uma exigência legal de que o estoque de alevinos repovoadores possua mesmo material genético das populações selvagens locais. Sendo assim, a AES Tietê (com. pessoal) realiza capturas anuais de curimatá (que serão utilizados como reprodutores) nos trechos dos rios a serem repovoados. A empresa afirma que as matrizes, assim como os alevinos resultantes, são devolvidas para o mesmo trecho do rio de onde foram retirados. Quanto às outras empresas, não obtivemos uma informação detalhada.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a perda da variabilidade haplotípica devida ao manejo inadequado dos estoques reprodutores. No presente estudo foram obtidos valores de diversidade considerados de moderados a altos, porém, para detectar perda de variabilidade é necessário um acompanhamento a longo prazo nestas amostras.

Em relação ao fluxo gênico entre as amostras, embora atualmente seja praticamente inexistente devido às barragens, foram encontrados valores de *F_{st}* que indicam que as amostras possuíam fluxo gênico até recentemente. A exceção é a amostra de Jaborandi, do Rio Pardo, que apresentou valores significativamente baixos de *F_{st}* na comparação com outras amostras. Dessa forma, devido à grande diferenciação observada, esta ausência de fluxo reflete relações passadas entre a amostra de Jaborandi e as demais.

Outras amostras do Rio Pardo devem ser incluídas nesta análise para que a hipótese de que haja uma sub-estruturação populacional na área estudada seja verificada. Outro fator que deve ser levado em consideração é o fato de que todas as amostras foram obtidas de pescadores da região, sendo assim, apesar do esforço de coleta empregado para que apenas amostras provenientes dos trechos dos rios de interesse fossem incluídas na análise, não se pode excluir a possibilidade de uma falsa comunicação da localidade de coleta em relação à amostra de Jaborandi. A ampliação das análises para outros trechos tanto do Rio Pardo quanto de outros rios, assim como novas coletas nos pontos já analisados, pode ajudar a elucidar a relação complexa entre as amostras utilizadas neste estudo.

Nas amostras dos rios Grande e Mogi-Guaçu, pode ocorrer fluxo gênico atual de duas formas: uma devida à operação das barragens, que levaria a um fluxo entre

localidades adjacentes através de abertura dos vertedouros na época das chuvas; e outra devida aos programas de repovoamento realizado pelas concessionárias das barragens, supondo que os pontos de coleta e soltura após a reprodução ocorram em trechos diferentes do rio.

O primeiro caso é relatado como possível na literatura que discute o impacto das barragens (Agostinho & Gomes, 2002), assim como por pescadores de algumas localidades visitadas, que dizem haver um aumento da pesca do curimbatá na região próxima à barragem logo após a abertura dos vertedouros.

O segundo caso não pode ser confirmado devido à falta de contato com a maioria das concessionárias de energia elétrica.

Desta forma, este trabalho pretende contribuir para o manejo do curimbatá na bacia do Rio Grande, fornecendo uma ferramenta poderosa para detectar a variabilidade e a estruturação populacional.

Em conclusão, as alterações ambientais provocadas pelas barragens (incluindo a impossibilidade de migração a montante) não geraram, a curto prazo, diferenças significativas entre as amostras estudadas, assim como parecem não estar diminuindo a variabilidade genética do curimbatá, comparada com populações naturais do Rio Aquidauana, MS (dados não publicados).

Estudos de longo prazo devem ser realizados no intuito de auxiliar o manejo desta espécie, que possui grande importância econômica para a região. O objetivo pretendido é o de apresentar um parâmetro de comparação para estudos futuros, especialmente aqueles que enfoquem o monitoramento da variabilidade genética do curimbatá.

6. Conclusões

As conclusões deste trabalho foram as seguintes:

1. Uma conclusão indireta deste trabalho é a de que o estoque pesqueiro em alguns trechos da região estudada (bacia do Rio Grande, incluindo Rio Pardo e Rio Mogi-Guaçu) encontra-se diminuído desde a construção de barragens no local, sendo que em alguns casos há relatos de diminuição levando à falta local de curimbatá desde que a concessionária de energia elétrica parou de realizar repovoamento. Este parece ser o caso da região entre as barragens de Estreito e Peixoto no Rio Grande.
2. Os valores observados dos índices de diversidade genética foram considerados de alto a moderados, sendo que os pontos principais de maior diversidade são aqueles onde ainda são encontrados trechos livres de rio e lagoas marginais, ou seja, onde o impacto ambiental foi menor. As localidades são Pirassununga, no Rio Mogi-Guaçu, e Jaborandi, no Rio Pardo.
3. As alterações ambientais provocadas pelas barragens não geraram divergência significativa entre os estoques estudados, assim como parecem não estar diminuindo a variabilidade genética do curimbatá. Porém estudos de longo prazo devem ser realizados no intuito de auxiliar o manejo desta espécie, que possui grande importância econômica para a região estudada.
4. A análise dos dados sugere que há divergência significativa entre a amostra de Jaborandi e as outras (seis do Rio Grande e duas do Rio Mogi-Guaçu), mas que as outras entre si tiveram, até recentemente, um fluxo que impossibilitou a divergência por deriva. Sendo assim, propusemos a hipótese da existência de duas sub-populações, uma representada por Jaborandi e a outra pelas amostras restantes.
5. Verificamos que a maior parte da variabilidade é encontrada dentro das amostras. A menor parcela de variabilidade foi encontrada entre os grupos do Rio Grande e Mogi-Guaçu (quando Jaborandi é excluída das análises), sugerindo ausência de estruturação entre o Rio Grande e o Rio Mogi-Guaçu.
6. Observamos que as amostras passaram por um evento de expansão populacional, no tempo calculado de 238 mil anos, que corresponde ao Pleistoceno Médio, época de grandes mudanças climáticas na América do Sul.

7. Não foi encontrada uma relação direta entre a geografia e a análise filogenética dos haplótipos. Em alguns casos foi possível estabelecer um agrupamento dos haplótipos encontrados em Jaborandi (como no filograma Fitch-Margoliash e na rede de haplótipos). Na relação entre as amostras também não foi identificada uma relação direta com a distribuição geográfica, o que evidencia a dificuldade de se trabalhar numa escala microgeográfica.

7. Referências Bibliográficas

- AES Tietê. 2004. Site oficial da AES Tietê, concessionária de energia elétrica. Endereço eletrônico: <http://www.aestiete.com.br>
- Agostinho, A.A. 1994. Pesquisa, monitoramento e manejo da fauna aquática em empreendimentos hidrelétricos. *In: Seminário sobre a fauna aquática e setor elétrico brasileiro: gerenciamento de bacias hidrográficas e a fauna aquática*. Comitê Coordenador das Atividades de Meio Ambiente do Setor Elétrico – COMASE, ELETROBRÁS. Rio de Janeiro.
- Agostinho, A.A. & Gomes, L.C. 2002. As escadas de peixes no contexto da conservação dos recursos naturais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia** (junho). Porto Alegre, RS.
- Agostinho, A.A. & Júlio-Jr, H.F. 1999. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Neotropicais**. Lowe-McConnell, R.H. Edusp, São Paulo, SP.
- Agostinho, A.A.; Miranda, L.E.; Bini, L.M.; Gomes, L.C.; Thomaz, S.M. & Suzuki, H.I. 1999. Patterns of colonization in Neotropical reservoirs, and prognoses on aging. *In: Theoretical Reservoir Ecology and its Applications*. Tundisi, J.G. & Straskraba, M (eds). International institute of ecology, Brazilian academy of sciences and Backhuys Publishers. São Carlos, SP.
- Avise, J.C. 1992. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. **Evolution** **43** (6): 1192-1208.
- Avise, J.C. 1994. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall, NY, USA.
- Avise, J.C.; Giblin-Davidson, C.; Laerm, J.; Patton, J.C. & Lansman, R.A. 1979a. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**: 6694-6698.
- Avise, J.C.; Lansman, R.A. & Shade, R.O. 1979b. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. **Genetics** **92**: 279-295.
- Azevedo, P. 1970. Principais peixes das águas interiores de São Paulo: Hábitos de vida. **Comissão interestadual da bacia Paraná-Uruguai, Poluição e Piscicultura**. Faculdade de Saúde Pública da USP.
- Bandelt, H-J.; Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol Biol Evol** **16**: 37-48.
- Barbieri, G.; Salles, F.A. & Cestarolli, M.A. 2000. Análise populacional do curimatá, *Prochilodus lineatus*, do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga/SP (Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca** **26** (2): 137-145.

- Barbosa, F.A.R.; Padisák, J.; Espíndola, E.L.G.; Borics, G. & Rocha, O. 1999. The cascading reservoir continuum concept (CRCC) and its application to the river Tietê-basin, São Paulo state, Brazil. *In: Theoretical Reservoir Ecology and its Applications*. Tundisi, J.G. & Straskraba, M (eds). International institute of ecology, Brazilian academy of sciences and Backhuys Publishers. São Carlos, SP.
- Bermingham, E. & Avise, J.C. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. **Genetics** **113**: 939-965.
- Bernatchez, L. & Dodson, J.J. 1991. Phylogeographic structure in mitochondrial DNA of the Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and its relation to Pleistocene glaciations. **Evolution** **45** (4): 1016-1035.
- Britski, H.A. 1995. As bacias hidrográficas e a preservação da biodiversidade. *In: Seminário sobre a fauna aquática e setor elétrico brasileiro: gerenciamento de bacias hidrográficas e a fauna aquática*. Comitê Coordenador das Atividades de Meio Ambiente do Setor Elétrico – COMASE, ELETROBRÁS. Rio de Janeiro.
- Brown, W.M.; George, M. Jr. & Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**: 1967-1971.
- Calcagnotto, D. 1998. Caracterização de bancos genéticos selvagens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através da análise do DNA mitocondrial. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências, USP, São Paulo/SP.
- Campbell-Jr, K.E. 1982. Late Pleistocene events along the coastal plain of northwestern South América. *In: Biological diversification in the tropics*. Prance, G.T. (ed). Columbia University Press, NY.
- Castro, R.M.C. 1990. Revisão Taxonômica da Família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes). **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, SP.
- CEMIG. 2004. Site oficial da CEMIG, concessionária de energia elétrica. Endereço eletrônico: <http://www.cemig.com.br>
- Clifford, S.L.; McGinnity, P. & Ferguson, A. 1998. Genetic change in an Atlantic salmon population resulting from escaped juvenile farm salmon. **J. Fish Biol.** **52**: 118-127.
- CPLF. 2004. Site oficial da AES Tietê, concessionária de energia elétrica. Endereço eletrônico: <http://www.cpfl.com.br>
- Crosetti, D.; Nelson, W.S. & Avise, J.C. 1994. Pronounced genetic structure of mitochondrial DNA among populations of the circumglobally distributed Grey Mullet (*Mugil cephalus*). **J. Fish Biol.** **44**: 47-58.
- Densmore, L.D.; Wright, J.W. & Brown, W.M. 1985. Length variation and heteroplasmy a frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards (genus *Cnemidophorus*). **Genetics** **110**: 689-707.

- Donaldson, K.A. & Wilson, R.R. 1999. Amphi-Panamaic germinates of snook (Percoidae: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rates in the mitochondrial DNA control region of fishes. **Mol. Phylogenet. Evol.** **13**: 208-213.
- Excoffier, L.; Smouse, P. & Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** **131**: 479-491.
- Felsenstein, J. 2004. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6**. Distribuído pelo autor. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fluxus Technology. 2004. **Network 4.1.1.2**. Endereço eletrônico: <http://www.fluxus-engineering.com> (consultado em 12/12/2005).
- Fu, Y.X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** **147**: 915-925.
- FURNAS. 2004. Site oficial de FURNAS, concessionária de energia elétrica. Endereço eletrônico: <http://www.furnas.com.br>
- Girard, P. 2002. **Efeito cumulativo das barragens no Pantanal**. Instituto centro vida. Campo Grande, MS.
- Godoy, M.P. 1970. Migração dos peixes – marcação. **Comissão interestadual da bacia Paraná-Uruguaí, Poluição e Piscicultura**. Faculdade de Saúde Pública da USP.
- Godoy, M.P. 1975. **Peixes do Brasil, sub-ordem Characoidei da bacia do rio Mogi-Guaçu**. Vol. 4. Ed. Franciscana, Piracicaba, SP.
- González-Villaseñor, L.I. & Powers, D.A. 1990. Mitochondrial-DNA restriction-site polymorphisms in the teleost *Fundulus heteroclitus* support secondary intergradation. **Evolution** **44** (1): 27-37.
- Graves, J.E. 1998. Molecular insight into the population structures of cosmopolitan marine fishes. **J. Hered.** **89** (5): 427-437.
- Hansen, M.M. & Loeschcke, V. 1996. Genetic differentiation among Danish brown trout populations, as detected by analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. **J. Fish Biol.** **48**: 422-436.
- Harrison, R.G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Tree** **4** (1): 6-11.
- HidroWeb. 2004. Sistema de informações hidrológicas da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL). Os mapas on-line estão em formato ArcView. Endereço eletrônico: <http://hidroweb.aneel.gov.br> (consultado em 04/06/2004).
- Iguchi, K.; Watanabe, K. & Nishida, M. 1999. Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations. **Aquaculture** **178**: 235-243.

- Ikeda, M. & Taniguchi, N. 2002. Genetic variation and divergence in populations of ayu *Plecoglossus altivelis*, including endangered subspecies, inferred from PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. **Fisheries Science** **68**: 18-26.
- Ittig, R.E.G. & Gardenal, C.N. 2002. Haplotype diversity of the mitochondrial DNA D-loop region in *Calomys musculus* (Rodentia, Muridae) detected by PCR-RFLP. **Biochemical Gen.** **40(9/10)**: 293-302.
- Lacroix, J.M. 1993. GEL version 1.2 Flórida.
- Larinier, M. 2000. Environmental issues: Dams and fish migration. *In*: Thematic review II.1: Dams, ecosystem functions and environmental restoration. **Contributing paper. World Commission on Dams**. Publicação eletrônica. <http://www.dams.org> (consultado em 20/04/2004).
- Lei nº 12.488 de 09 de abril de 1997. Torna obrigatória a construção de escadas para peixes de piracema em barragem edificada pelo Estado de Minas Gerais.
- Lei nº 9.798 de 07 de outubro de 1997. Dispõe sobre a construção de escadas para peixes em barragens edificadas em cursos de água de domínio do Estado de São Paulo.
- Lowe-McConnell, R.H. 1999. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Neotropicais**. Edusp, São Paulo, SP.
- Macey, J.R.; Larson, A.; Ananjeva, N.B.; Fang, Z & Papenfuss, T.J. 1997. Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. **Mol. Biol. Evol.** **14 (1)**: 91-104.
- Macey, J.R.; Schulte II, J.A.; Ananjeva, N.B.; Larson, A.; Rastegar-Pouyani, N.; Shammakov, S.M. & Papenfuss, T.J. 1998. Phylogenetic relationships among agamid lizards of the *Laudakia caucasia* species group: Testing hypotheses of biogeographic fragmentation and an area cladogram for the Iranian Plateau. **Mol. Phylog. Evol.** **10**: 118-131.
- Magalhães, A. C. 1931. **Monographia Brasileira de Peixes Fluviais**. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo, SP.
- Marques, D.K.S. 2002. Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros. **Documentos** **36**. Embrapa. Corumbá, MS.
- Martins, S.L. 2000. Sistemas para a transposição de peixes. **Dissertação de Mestrado**. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, SP.
- McElroy, D.; Moran, P.; Bermingham, E. & Kornfield, I. 1992. REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. **J. Hered.** **83**:157-158.
- Moritz, C. & Brown, W.M. 1986. Tandem duplication of D-loop and ribosomal RNA sequences in lizard mitochondrial DNA. **Science** **233**: 1425-1427.
- Moysés, C.B. 2005. Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes). **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

- Moysés, C.B. & Almeida-Toledo, L.F. 2002. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish espécies of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology** **25** (4): 401-407.
- Müller, A.C. 1995. **Hidrelétricas, meio ambiente e desenvolvimento**. Itaipu Binacional. Makron Books.
- Nei, M. 1987. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York. 512pp.
- Nei, M. & Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **76**: 5269-5273.
- Nei, M. & Miller, J.C. 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. **Genetics** **125**:873-879.
- Nei, M. & Tajima, F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics** **97**:145-163.
- Nyakaana, S. & Arctander, P. 1999. Population genetic structure of the African elephant in Uganda base don variation at mitochondrial and nuclear loci: evidence for male-biased gene flow. **Mol. Ecol.** **8**: 1105-1115.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers Ver. 1.6.6 (2001). **Computer Applications in the Biosciences** **12**: 357-358.
- Paiva, M.P.; Andrade-Turbino, M.F. de & Godoy, M.P. 2002. **As represas e os peixes nativos do rio Grande. Bacia do Paraná – Brasil**. Ed. Interciência, Rio de Janeiro.
- Passoni, J.C. 1998. Caracterização de lagartos do grupo *nanuzae* do gênero *Tropidurus* (Iguania: Tropiduridae) através da análise de padrões de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências, USP, São Paulo, SP.
- Pauls, E. 1985. Considerações sobre a evolução cromossômica e sistema de cromossomos supranumerários em espécies do gênero *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências, UFSCAR, São Carlos,SP.
- Petts, G.E. 1984. The impounded river. *In: Impounded rivers: perspectives for ecological management*. Qichester, John, Wiley & Sons.
- Prado-Jr, F.A.A. & Amaral, C.A. 2000. **Pequenas centrais hidrelétricas no estado de São Paulo**. CSPE.
- Primack, R.; Rozzi, R; Massardo, F. & Feinsinger, P. 2001. Destrucción y degradación del hábitat. *In: Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas*. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. **Evolution** **49**: 1280-1283.
- Reis, R.E.; Kullander, S.O. & Ferraris, C.J. 2003. **CLOFFSCA - The Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs. Porto Alegre, RS.

- Revaldaves, E.; Renesto, E. & Machado, M.F.P.S. 1997. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Parana river. **Braz. Journal of Genetics**, **20**: 381-388.
- Roff, D.A. & Bentzen, P. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. **Mol. Biol. Evol.** **6**: 539-545.
- Rozzi, R.; Primack, R.; Feinsinger, P.; Dirzo, R. & Massardo, F. 2001. Qué es la biología de la conservación? *In*: **Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas**. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Sambrook, E.; Fritsch, F. & Maniatis, T. 1989. **Molecular cloning, A Laboratory Manual**. 2ªed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanetra, M. & Crozier, R.H. 2003. Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. **Mol. Ecol.** **12**: 2281-2295.
- Schneider, S.; Roessli, D. & Excoffier, L. 2000. **Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000**. Distribuído pelo autor. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology, University of Geneva.
- Sirol, R.N. 2003. Conservação e manejo da ictiofauna. **II Simpósio Brasileiro de Aquicultura – cursos**. Botucatu, SP.
- Slatkin, M. 1994. An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. **Genet. Res.** **64 (1)**: 71-74.
- Slatkin, M. 1996. A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. **Genet. Res.** **68**: 259-260.
- Sivasundar, A.; Bermingham, E. & Ortí, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Mol. Ecol.** **10**: 407-418.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** **123** : 585-595.
- Templeton, A.R.; Routman, E. & Phillips, C. 1995. Separating population structure from population history : a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics** **140** : 767-782.
- Thornton, K.W. 1980. Sedimentary processes. *In*: **Reservoir limnology: ecological perspectives**. Wiley & Sons. New York, NY.
- Toledo-Filho, S.A. 1981. Biologia Populacional do Curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae) do Rio Mogi-Guaçu: Aspectos Quantitativos. **Tese de Livre Docência**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

- Toledo-Filho, S.A.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Galhardo, E. & Donola, E. 1992. Conservação Genética de Peixes em Projetos de Repovoamento de Reservatórios. **Cadernos de Ictiogenética 1**. CCS/USP, São Paulo, SP.
- Toledo-Filho, S.A., Calcagnotto, D., Bernardino, G., Fernandes-Matioli, F.M.C., Moysés, C.B., Almeida-Toledo, L.F. & Foresti, F. 1999. Projeto de Bancos Genéticos na Piscicultura Brasileira. **Cadernos de Ictiogenética 5**. CCS/USP, São Paulo, SP.
- Toledo-Filho, S.A., Godoy, M.P. e Santos, E.P. 1987. Delimitação Populacional do Curimbatá, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae) do Rio Mogi-Guaçu, Brasil. **Rev. Brasil. Biol.**, **47** (4): 501-506.
- Toledo-Filho, S.A.; Godoy, M.P. e Santos, E.P. 1986. Curva de Migração do Curimbatá, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae) na Bacia Superior do Rio Paraná, Brasil. **Rev. Brasil. Biol.**, **46** (2): 447-452.
- Triantafyllidis, A.; Abatzopoulos, T.J. & Economidis, P.S. 1999. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, Siluridae) populations, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. **Heredity 82**: 503-509.
- Tundisi, J.G. 1987. Ecologia, limnologia e aspectos socioeconômicos da construção de hidrelétricas nos trópicos. In: **Anais do Encontro de Tropicologia 4**: 47-85. Disponível também na Biblioteca Virtual de Tropicologia. Endereço eletrônico: http://www.tropicologia.org.br/conferencia/1987ecologia_limnologia.html (consultado em 18/07/2004).
- Tundisi, J.G.; Matsumura-Tundisi, T. & Calijuri, M.C. 1993. Limnology and management of reservoirs in Brazil. In: **Comparative reservoir limnology and water quality management**. Straskraba, M.; Tundisi, J.G. & Duncan, A. (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Ward, R.D. ; Skibinski, D.O.F. & Woodwark, M. 1992. Protein heterozygosity, protein structure and taxonomic differentiation. **Evol. Biol.** **26**: 73-159.
- Weitzman, S.H. & Weitzman, M. 1982. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. In: **Biological diversification in the tropics**. Prance, G.T. (ed). Columbia University Press, NY.
- Wirgin, I.; Proença, R. & Grossfield, J. 1989. Mitochondrial DNA diversity among populations of striped bass in the southeastern United States. **Can. J. Zool.** **67**: 891-907.

8. Anexos

Anexo 1: Mapas de restrição da região *D-loop* do mtDNA. As enzimas *Pst*I, *Pvu*II e *Stu*I não estão representadas, pois não possuem sítio de restrição no fragmento.

Anexo 2: Mapas de restrição do fragmento ND2-CO1 do mtDNA. A enzima *Pst*I não está representada, pois não possui sítio de restrição no fragmento.

Anexo 3: Matriz obtida na análise de restrição da região *D-loop* do mtDNA. As enzimas utilizadas (da esquerda para a direita) são: *AluI*, *BamHI*, *DdeI*, *DraI*, *HaeIII*, *Hinfi*, *MluI*, *MspI*, *PstI*, *PvuII*, *ClaI*, *MboI*, *RsaI*, *ScaI* e *StuI*. 0 = ausência de sítio de restrição, e 1 = presença de sítio de restrição.

h1	AACCBABAAAAAA	0001101000110110010010111111011111
h2	AACCCBABAAAAAA	0001101000110110110010111111011111
h3	ABCCBBAAAAAA	00011110001101100100100111111011111
h4	AABCCBAAAAAA	00011001001101101100100111111011111
h5	AAECBBABAAAAAA	00011010101101100100101111111011111
h6	BACCBABAAAAAA	10011010001101100100100111111011111
h7	ABACCBABAAAAAA	00011100001101101100101111111011111
h8	BABCCBABAAAAAA	10011001001101101100101111111011111
h9	CACBAAABAAAAAA	01011010001100100000001111111011111
h10	AACBAAABAAAAAA	00011010001100100000001111111011111
h11	AAGDBBABAAAAAA	00011011011000100100101111111011111
h12	AAACBBABAAABAAA	000110000011011001001011111011011111
h13	DAACBBABAAAAAA	00111000001101100100101111111011111
h14	ABCBBCAAAAAAA	00011110001100100110100111111011111
h15	AACCBABAAABAAA	000110100011011001101011111011011111
h16	AACBCCAABAAABAAA	00011010001100101110100111011011111
h17	ABFCBBAAAAAA	00011111001101100100100111111011111
h18	BBACCBABAAAAAA	10011100001101101100101111111011111
h19	AADCBBABAAABAAA	00011010011101100100101111111010111
h20	BBABCDAAAAAA	10011100001100101101100111111011111
h21	CACCBABAAABAAA	010110100011011001001011111011011111
h22	CACCBABAAAAAA	01011010001101100100101111111011111
h23	AACCBABAAACAAA	00011010001101100100101111101011111
h24	DACCBABAAAAAA	00111010001101100100101111111011111
h25	AACCBBBBAAAAAA	00011010001101100100111111111011111
h26	AACCBABAAABAAA	000110100011011001001011111011011111
h27	AAACBBABAAAAAA	00011000001101100100101111111011111
h28	BACCBABAAACAAA	10011010001101100100101111101011111
h29	AAACCBAAAAACAA	00011000001101101100100111111111111
h30	AACCBABAAAAAA	00011010001101100100100111111011111
h31	EABCCBABAAAAAA	11011001001101101100101111111011111
h32	AACBBBABAAAAAA	00011010001100100100101111111011111
h33	BACCBABAAAAAA	10011010001101100100101111111011111

h34	AACBBBAAAAAAAAA	00011010001100100100100111111011111
h35	BACCCBABAAAAAAAAA	10011010001101101100101111111011111
h36	AACCB CABAAAAAAAAA	00011010001101100110101111111011111
h37	AACCB BABAAAABAA	00011010001101100100101111111010111
h38	AABCCBABAAAAAAAAA	00011001001101101100101111111011111
h39	BACCAAABAAAAAAAAA	10011010001101100000001111111011111
h40	AACCAAABAAACAAA	00011010001101100000001111101011111
h41	AACCAAABAAAAAAAAA	00011010001101100000001111111011111
h42	BABCAAABAAAAAAAAA	10011001001101100000001111111011111
h43	AAACAAABAAAAAAAAA	00011000001101100000001111111011111
h44	AACAAAAAAAAABAAA	00011010001110110000000111011011111
h45	BBABAAAAAAAAAAAAA	10011100001100100000000111111011111
h46	DAACAAABAAAAAAAAA	00111000001101100000001111111011111
h47	CAACAAABAAAAAAAAA	01011000001101100000001111111011111
h48	AADCBBABAAAAAAAAA	00011010011101100100101111111011111
h49	DACCB CABAAABAAA	00111010001101100110101111011011111
h50	AAABBBABAAAAAAAAA	00011000001100100100101111111011111
h51	AACABBABAAAAAAAAA	00011010001110110100101111111011111
h52	ABCCCBABAAAAAAAAA	00011110001101101100101111111011111
h53	BBCCCBABAAAAAAAAA	10011110001101101100101111111011111
h54	AACCB BAAAAABAA	00011010001101100100100111111010111
h55	AAECBBABAAADAAA	00011010101101100100101111000011111

ANEXO 4: Matriz dos valores de divergência (d) obtidos na análise dos haplótipos da região *D-loop*.

haplótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2	0,51													
3	1,06	1,56												
4	2,33	1,74	2,30											
5	0,54	1,03	1,57	3,01										
6	1,07	1,61	1,06	2,33	1,59									
7	1,60	1,07	1,59	1,60	2,21	2,69								
8	2,23	1,68	3,27	1,03	2,89	2,23	1,54							
9	2,33	2,86	3,54	5,46	2,96	3,56	4,35	5,21						
10	1,79	2,33	3,00	4,94	2,45	3,00	3,85	4,72	0,61					
11	2,40	2,87	3,59	3,48	3,02	3,48	4,36	3,34	3,91	3,40				
12	1,15	1,69	2,27	2,33	1,82	2,33	1,65	2,23	4,04	3,48	3,96			
13	1,11	1,62	2,18	2,23	1,74	2,23	1,58	2,13	3,85	3,32	3,79	1,13		
14	2,22	2,71	1,08	3,68	2,78	2,22	2,78	4,60	3,64	3,10	3,61	3,63	3,48	
15	1,08	1,59	2,14	3,65	1,66	2,19	2,78	3,50	3,64	3,10	3,61	1,31	2,33	2,20
16	2,82	2,19	2,83	3,17	3,38	2,82	3,48	4,14	4,50	3,91	4,24	3,10	4,17	1,66
17	1,57	2,05	0,53	1,57	2,12	1,57	2,19	2,54	4,14	3,63	2,88	2,90	2,78	1,66
18	2,09	1,54	2,10	2,09	2,67	2,09	0,49	1,03	4,85	4,35	4,80	2,18	2,09	3,27
19	1,08	1,59	2,14	3,65	1,66	2,19	2,78	3,50	3,64	3,10	2,27	2,43	2,33	3,38
20	3,96	3,34	2,78	2,87	4,60	2,87	2,09	2,76	5,97	5,46	5,63	4,07	3,89	3,01
21	1,07	1,61	2,17	3,49	1,59	2,24	2,69	3,34	2,33	3,00	3,48	1,15	2,23	3,34
22	0,51	1,03	1,56	2,83	1,03	1,61	2,09	2,72	1,71	2,33	2,87	1,69	1,62	2,71
23	0,54	1,07	1,63	2,96	1,08	1,68	2,18	2,83	3,00	2,44	2,99	1,77	1,69	2,83
24	0,51	1,03	1,56	2,83	1,03	1,61	2,09	2,72	2,86	2,33	2,87	1,69	0,57	2,71
25	0,52	1,01	1,59	2,78	1,04	1,56	2,11	2,67	2,87	2,36	3,01	1,67	1,60	2,79
26	0,54	1,07	1,63	2,96	1,08	1,68	2,18	2,83	3,00	2,44	2,99	0,62	1,69	2,83
27	0,59	1,11	1,67	1,69	1,25	1,69	1,07	1,62	3,32	2,79	3,33	0,57	0,54	2,99
28	1,07	1,61	2,17	3,49	1,59	1,07	2,69	2,23	3,56	3,00	3,48	2,33	2,23	3,34
29	2,23	1,62	2,18	1,11	2,83	2,23	1,58	2,13	5,14	4,59	4,92	2,36	2,25	3,48
30	0,54	1,07	0,55	1,82	1,08	0,54	2,18	2,83	3,00	2,44	2,99	1,77	1,69	1,73
31	2,72	2,14	3,75	1,54	3,36	2,72	2,01	0,48	4,52	5,21	3,81	2,76	2,64	5,06
32	0,56	1,08	1,71	2,96	1,11	1,67	2,26	2,84	1,81	1,23	1,82	1,79	1,71	1,67
33	0,51	1,03	1,56	2,83	1,03	0,51	2,09	1,68	2,86	2,33	2,87	1,69	1,62	2,71
34	1,13	1,67	1,20	2,45	1,67	1,13	2,87	3,48	2,49	1,90	2,42	2,44	2,33	1,16
35	1,03	0,49	2,07	2,23	1,52	1,03	1,54	1,16	3,40	2,86	3,34	2,23	2,13	3,20
36	0,54	1,03	1,57	3,01	1,13	1,59	2,21	2,89	2,96	2,45	3,02	1,82	1,74	1,63
37	0,54	1,07	1,63	2,96	1,08	1,68	2,18	2,83	3,00	2,44	2,99	1,77	1,69	2,83
38	1,74	1,20	2,78	0,51	2,43	2,83	1,07	0,49	4,72	4,22	2,87	1,69	1,62	4,14
39	1,69	2,23	2,81	4,72	2,33	1,69	3,61	3,38	1,76	1,20	4,44	3,32	3,17	4,14
40	1,77	2,33	2,94	4,95	2,43	3,03	3,77	4,72	1,85	1,25	4,64	3,48	3,32	4,33
41	1,15	1,69	2,27	4,20	1,82	2,33	3,11	4,02	1,20	0,62	3,96	2,76	2,64	3,63
42	3,53	4,02	4,62	2,89	4,47	3,53	3,61	1,62	3,32	2,79	4,44	3,32	3,17	6,33
43	2,11	2,64	3,25	3,32	3,03	3,32	2,35	3,17	1,95	1,38	5,57	1,93	1,84	4,92
44	4,28	4,81	4,37	6,17	4,87	4,28	6,39	7,15	3,17	2,58	5,96	4,81	5,85	4,37
45	4,56	5,08	3,25	4,56	5,41	3,35	3,57	4,35	3,24	2,65	6,79	4,58	4,35	3,68
46	2,64	3,17	3,77	3,87	3,53	3,87	2,88	3,69	2,52	1,95	6,03	2,52	1,22	5,41
47	2,64	3,17	3,77	3,87	3,53	3,87	2,88	3,69	1,32	1,95	6,03	2,52	2,40	5,41
48	0,54	1,03	1,57	3,01	1,13	1,59	2,21	2,89	2,96	2,45	1,71	1,82	1,74	2,78
49	1,59	2,10	2,65	4,15	2,15	2,72	3,27	3,98	4,17	3,64	4,08	1,82	1,74	2,71
50	1,19	1,71	2,36	2,33	1,86	2,33	1,73	2,23	2,82	2,26	2,76	1,20	1,14	2,45
51	1,75	2,22	2,91	4,01	2,24	2,79	3,41	3,85	2,87	2,36	3,01	2,95	2,83	2,79
52	1,01	0,50	1,01	2,21	1,51	2,07	0,53	2,12	3,38	2,87	3,45	2,18	2,09	2,05
53	1,50	0,97	1,51	2,67	1,97	1,50	1,00	1,61	3,89	3,38	3,90	2,69	2,58	2,54
54	1,12	1,68	1,10	2,43	1,66	1,12	2,81	3,49	3,74	3,15	3,64	2,45	2,33	2,32
55	2,30	2,86	3,46	5,11	1,67	3,59	4,09	4,87	5,19	4,60	4,95	2,54	3,66	4,76

Continuação do anexo 4.

haplótipos	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16	1,66													
17	2,69	3,38												
18	3,27	3,96	2,67											
19	2,24	4,07	2,69	3,27										
20	5,27	3,66	3,44	1,54	5,27									
21	1,08	2,82	2,65	3,19	2,19	5,15								
22	1,59	3,36	2,05	2,58	1,59	4,45	0,51							
23	1,66	3,52	2,14	2,69	1,66	4,64	1,68	1,07						
24	1,59	3,36	2,05	2,58	1,59	4,45	1,61	1,03	1,07					
25	1,57	3,34	2,07	2,57	1,57	4,47	1,56	1,01	1,06	1,01				
26	0,57	2,29	2,14	2,69	1,66	4,64	0,54	1,07	1,12	1,07	1,06			
27	1,82	3,64	2,30	1,58	1,82	3,38	1,69	1,11	1,15	1,11	1,11	1,15		
28	2,19	4,08	2,65	2,09	2,19	3,96	2,24	1,61	0,54	1,61	1,56	1,68	1,69	
29	3,49	2,96	2,78	2,09	3,49	2,75	3,44	2,76	2,89	2,76	2,69	2,89	1,69	3,44
30	1,66	2,29	1,08	2,69	1,66	3,48	1,68	1,07	1,12	1,07	1,06	1,12	1,15	1,68
31	3,98	4,62	3,03	1,48	3,98	3,21	2,72	2,14	3,34	3,20	3,14	3,34	2,13	2,72
32	1,67	2,34	2,22	2,75	1,67	3,48	1,67	1,08	1,13	1,08	1,15	1,13	1,19	1,67
33	1,59	3,36	2,05	1,54	1,59	3,34	1,61	1,03	1,07	1,03	1,01	1,07	1,11	0,51
34	2,29	1,77	1,73	3,38	2,29	2,96	2,31	1,67	1,75	1,67	1,71	1,75	1,79	2,31
35	2,10	2,70	2,54	1,03	2,10	2,76	2,14	1,54	1,61	1,54	1,50	1,61	1,62	1,03
36	0,51	2,19	2,12	2,67	1,66	4,60	1,59	1,03	1,08	1,03	1,04	1,08	1,25	1,59
37	1,66	3,52	2,14	2,69	0,57	4,64	1,68	1,07	1,12	1,07	1,06	1,12	1,15	1,68
38	3,01	3,66	2,05	1,54	3,01	3,34	2,83	2,23	2,33	2,23	2,21	2,33	1,11	2,83
39	2,96	4,93	3,41	2,98	2,96	5,18	2,89	2,23	2,33	2,23	2,18	2,33	2,64	1,69
40	3,10	5,19	3,56	4,30	3,10	6,70	3,03	2,33	1,21	2,33	2,27	2,45	2,76	1,77
41	2,43	4,37	2,90	3,61	2,43	5,90	2,33	1,69	1,77	1,69	1,67	1,77	2,11	2,33
42	5,15	7,19	3,41	2,98	5,15	5,18	4,72	4,02	4,20	4,02	3,95	4,20	2,64	3,53
43	3,68	5,72	4,13	2,88	3,68	5,08	3,32	2,64	2,76	2,64	2,60	2,76	1,28	3,32
44	4,37	3,80	4,94	6,88	5,63	6,66	4,28	4,81	5,05	4,81	4,87	3,75	5,33	5,60
45	6,18	5,72	4,13	2,88	6,18	2,64	5,88	5,08	5,33	5,08	5,09	5,33	3,80	4,56
46	4,20	6,27	4,62	3,41	4,20	5,60	3,87	3,17	3,32	2,02	3,11	3,32	1,84	3,87
47	4,20	6,27	4,62	3,41	4,20	5,60	2,64	2,02	3,32	3,17	3,11	3,32	1,84	3,87
48	1,66	3,38	2,12	2,67	0,51	4,60	1,59	1,03	1,08	1,03	1,04	1,08	1,25	1,59
49	0,51	2,19	3,18	3,75	2,75	5,75	1,59	2,10	2,19	1,03	2,05	1,08	2,33	2,72
50	2,45	3,16	2,99	2,24	2,45	2,86	2,33	1,71	1,79	1,71	1,77	1,79	0,60	2,33
51	2,79	3,34	3,36	3,85	2,79	4,47	2,79	2,22	2,31	2,22	2,36	2,31	2,37	2,79
52	2,05	2,71	1,50	1,00	2,05	2,67	2,07	1,50	1,56	1,50	1,53	1,56	1,60	2,07
53	2,54	3,20	1,98	0,51	2,54	2,12	2,58	1,99	2,07	1,99	1,99	2,07	2,09	1,50
54	2,30	2,96	1,63	3,34	1,12	4,14	2,35	1,68	1,77	1,68	1,63	1,77	1,77	2,35
55	2,34	4,27	4,00	4,62	3,57	6,83	2,30	2,86	1,74	2,86	2,77	1,74	3,10	2,30

Continuação do anexo 4.

haplótipos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														
19														
20														
21														
22														
23														
24														
25														
26														
27														
28														
29														
30	1,69													
31	2,64	3,34												
32	2,86	1,13	3,33											
33	2,76	1,07	2,14	1,08										
34	2,33	0,59	3,98	0,57	1,67									
35	2,13	1,61	1,61	1,60	0,49	2,21								
36	2,83	1,08	3,36	1,11	1,03	1,67	1,52							
37	2,89	1,12	3,34	1,13	1,07	1,75	1,61	1,08						
38	1,62	2,33	0,99	2,35	2,23	2,96	1,68	2,43	2,33					
39	4,42	2,33	3,85	2,33	1,11	3,00	1,62	2,33	2,33	4,02				
40	4,64	2,45	5,24	2,44	2,33	3,15	2,89	2,43	2,45	4,20	1,19			
41	3,87	1,77	4,52	1,79	1,69	2,44	2,23	1,82	1,77	3,53	0,57	0,59		
42	4,42	4,20	2,13	4,22	2,90	4,94	3,38	4,47	4,20	2,23	1,51	2,76	2,11	
43	3,11	2,76	3,69	2,79	2,64	3,48	3,17	3,03	2,76	2,64	1,28	1,34	0,71	1,28
44	5,85	3,75	7,64	3,71	4,81	3,15	5,34	4,87	5,05	6,66	3,77	3,96	3,22	5,33
45	4,35	4,03	4,85	4,04	3,85	3,48	4,35	5,41	5,33	5,08	2,55	3,99	3,24	2,55
46	3,69	3,32	4,21	3,32	3,17	4,04	3,69	3,53	3,32	3,17	1,84	1,93	1,28	1,84
47	3,69	3,32	3,03	3,32	3,17	4,04	3,69	3,53	3,32	3,17	1,84	1,93	1,28	1,84
48	2,83	1,08	3,36	1,11	1,03	1,67	1,52	1,13	1,08	2,43	2,33	2,43	1,82	4,47
49	4,02	2,19	4,46	2,19	2,10	2,82	2,61	1,02	2,19	3,50	3,49	3,66	2,96	5,64
50	2,33	1,79	2,74	0,63	1,71	1,23	2,23	1,86	1,79	1,71	3,32	3,48	2,79	3,32
51	3,92	2,31	4,29	1,15	2,22	1,71	2,68	2,24	2,31	3,41	3,44	3,59	2,95	5,21
52	2,09	1,56	2,57	1,64	1,50	2,22	0,97	1,51	1,56	1,67	2,69	2,81	2,18	4,43
53	2,58	2,07	2,04	2,13	0,97	2,73	0,49	1,97	2,07	2,12	2,09	3,34	2,69	3,80
54	2,33	0,56	4,02	1,75	1,68	1,18	2,24	1,66	0,56	2,96	3,03	3,20	2,45	4,95
55	5,02	3,00	5,40	2,96	2,86	3,70	3,41	2,87	3,00	4,34	4,43	3,26	3,85	6,72

continuação do anexo 4.

haplótipos	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38												
39												
40												
41												
42												
43												
44	4,03											
45	2,60	4,03										
46	0,60	4,59	3,19									
47	0,60	4,59	3,19	1,20								
48	3,03	4,87	5,41	3,53	3,53							
49	4,20	4,87	6,70	3,53	4,72	2,15						
50	1,95	4,78	3,24	2,52	2,52	1,86	2,96					
51	3,92	2,29	5,09	4,40	4,40	2,24	3,25	1,77				
52	3,11	5,37	4,30	3,61	3,61	1,51	2,54	2,26	2,80			
53	3,61	5,87	3,61	4,11	4,11	1,97	3,03	2,75	3,24	0,47		
54	3,48	4,49	4,78	4,06	4,06	1,66	2,86	2,44	2,91	2,17	2,70	
55	5,20	5,91	7,99	5,77	5,77	2,87	2,87	3,81	4,04	3,30	3,83	3,79

Anexo 5: Distância genética de Nei (δ), abaixo da diagonal e em porcentagem, e distância geográfica, acima da diagonal e em quilômetros.

	CAR	COL	CAL	IGA	PED	GLO	JAB	PIR	PIN
CAR		220	265	430	495	575	290	530	640
COL	-0,0036%		45	210	275	355	70	310	420
CAL	-0,1561%	-0,1484%		165	230	310	80	320	430
IGA	0,0538%	-0,1191%	0,0231%		65	145	245	485	595
PED	-0,0311%	-0,1868%	-0,0173%	0,0445%		80	310	550	660
GLO	0,5230%	0,1383%	0,2102%	0,1496%	0,4468%		390	630	740
JAB	1,2455%	0,8034%	0,4850%	0,6728%	0,5986%	0,9705%		240	350
PIR	0,2403%	0,0096%	0,1219%	0,0355%	-0,1282%	0,2555%	-0,0240%		110
PIN	-0,1689%	-0,2502%	0,0722%	0,0590%	-0,1599%	0,2283%	0,8917%	0,1817%	

Anexo 6: Valores de F_{st} , abaixo da diagonal, e distância geográfica, acima da diagonal e em quilômetros.

	CAR	COL	CAL	IGA	PED	GLO	JAB	PIR	PIN
CAR		220	265	430	495	575	290	530	640
COL	0,013		45	210	275	355	70	310	420
CAL	0,012	0,009		165	230	310	80	320	430
IGA	0,005	-0,005	0,048		65	145	245	485	595
PED	0,014	0,028	0,102	0,014		80	310	550	660
GLO	0,124	0,066	0,221	0,092	0,256		390	630	740
JAB	0,413	0,414	0,533	0,447	0,477	0,533		240	350
PIR	0,034	-0,005	0,034	0,022	0,065	0,007	0,424		110
PIN	0,043	-0,013	0,048	0,029	0,099	0,222	0,452	0,037	