



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO**



Programa de Pós-Graduação - Mestrado  
Recursos Aquáticos e Pesca

**Centro de Educação, Ciências Exatas e Naturais - CECEN  
Mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca - PPGRAP**

**Variabilidade Genética de *Prochilodus* sp. (Characiformes, Prochilodontidae) em  
Bacias Hidrográficas do Estado do Maranhão.**

**Elidy Rayane de Rezende França**

**São Luís - MA  
Janeiro/2019**

**ELIDY RAYANE DE REZENDE FRANÇA**

**Variabilidade Genética de *Prochilodus* sp. (Characiformes, Prochilodontidae) em Bacias Hidrográficas do Estado do Maranhão.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Aquáticos e Pesca, Área de Concentração: Recursos Pesqueiros.**

**Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga - CESC/UEMA**

**São Luís - MA  
Janeiro/2019**

F814v França, Elidy Rayane de Rezende

Variabilidade genética de *Prochilodus* sp. (characiformes, prochilodontidae) em bacias hidrográficas do estado do Maranhão / Elidy Rayane de Rezende França. \_São Luís: UEMA, 2018.

64f.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Educação, Ciências Exatas e Naturais - CECEN, Curso de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca.

1. Taxonomia. 2. DNA mitocondrial. 3. DNA nuclear. 4. Divergência genética. I. Título.

CDU 597.554.1

**Variabilidade Genética de *Prochilodus* sp. (Characiformes, Prochilodontidae) em  
Bacias Hidrográficas do Estado do Maranhão.**

**Elidy Rayane de Rezende França**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga - Orientador  
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA**

---

**Profa. Dra. Ligia Tchaicka - Membro  
Universidade Estadual do Maranhão-CECEN/UEMA**

---

**Profa. Dra. Maria Claudene Barros - Membro  
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA**

**São Luís – MA  
Janeiro/2019**

*À minha família, que acreditou nos meus sonhos e nas oportunidades*

*Muito obrigada*

## *Agradecimentos*

A Deus

A Universidade Estadual do Maranhão pela formação,

A Capes pela concessão da bolsa, para realização do trabalho,

A Fapema pelo fomento do projeto,

Ao meu Orientador Elnary Fraga por todo conhecimento, paciência, compreensão ao longo da minha formação. À professora Dr<sup>a</sup> Maria Claudene por todo conhecimento transmitido ao longo desta jornada, incentivo e apoio.

A todos os professores do Mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca pelos ensinamentos durante o curso.

A minha Mãe Maria Cleonice Rodrigues de Rezende e meu Pai Edvaldo Barros França, pelo exemplo, amor, dedicação que sempre me apoiaram e ampararam quando se fez necessário, nunca me deixando desistir perante as reais dificuldades enfrentadas em minha jornada.

Obrigada a minha irmã Erika Thais, que mesmo de longe sempre me apoiou e escutou todos os meus delírios de fazer uma dissertação, e me aguentou noites e noites sem deixar ela dormir.

As minhas pequeninas Ingrid Kiara e Valentina, que sempre me encheram de amor e carinho.

A minha turma de Mestrado que me acompanhou por toda essa trajetória, e principalmente as minhas amigas de turma que me apoiaram nessa batalha São Luís /Caxias.

Agradeço imensamente a Sulamita Guimarães que me acolheu e apoiou nessa caminhada, aguentou meus delírios, meus momentos difíceis, que foi minha família esse período, e que me fez ver o mundo um jeito totalmente diferente.

Agradeço a todos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular – GENBIMOL, especialmente a Histelle, Marcelo, Cleison, Luzianny, Jordânia, Bruno pelos quase dois anos de trabalho, aprendizagem, divergências e muito crescimento profissional quanto pessoal. Agradeço a todos os responsáveis que me auxiliaram no início da minha caminhada.

*Meu muito obrigada!*

*“A ciência nunca  
resolve um problema  
sem criar pelo menos  
outros dez”. (George  
Bernard Shaw)*

## RESUMO

Na família Prochilodontidae, o gênero *Prochilodus* constitui um importante recurso pesqueiro. Os peixes deste gênero apresentam características morfológicas bastante conservada dificultando assim a identificação a nível de espécie, gerando incertezas quanto ao *status* taxonômico entre *Prochilodus lacustris* e *Prochilodus nigricans*. No presente trabalho objetivou-se determinar os índices de variabilidade genética de *Prochilodus* sp. nas principais bacias hidrográficas do estado do Maranhão, com base em sequências do DNA mitocondrial e nuclear. A amostragem foi constituída de espécimes das principais bacias hidrográficas Maranhenses (Tocantins, Itapecuru, Mearim, Turiaçu, Pericumã e Parnaíba) e da Bacia Amazônica (Santarém, Cupari, Xingu, Jacareacanga, Itaituba) coletados com diferentes apetrechos de pesca, sendo identificados de acordo com literaturas específicas e posterior confirmação por especialista. O material testemunho (voucher) foi depositado no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina/MZUEL e no Laboratório de Genética Biologia Molecular do CESC/UEMA. Amostra de tecido foram retirados e conservados em álcool 70% para análises genéticas. A extração do DNA total foi realizada a partir do tecido muscular utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification Promega seguindo instruções do fabricante com algumas modificações. O isolamento e amplificação dos genes de interesse foram realizados através da técnica de PCR utilizando *primers* específicos e posterior sequenciamento. Sequências de *Hoplias malabaricus* (GU702203.1) e *Leporinus* sp. (FJ418763.1) obtidas do GENBANK juntamente com sequências de *Leporinus* sp. e *Hoplias malabaricus* obtidas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA foram incorporadas as análises como outgroup para os marcadores rRNA16S, TROP, COI e Cyt *b*. Para as análises foram utilizados os programas BioEdit, DnaSPv6, MEGA 7, Arlequin 3.5. Os resultados revelaram sequências de 567pb para o gene rRNA16S, 574pb para o gene COI, 839pb para o gene Cyt *b* e 290pb para o marcador nuclear TROP, e mostraram uma forte similaridade genética entre *P. lacustris* e *P. nigricans* com valores de divergência genética de 0% a 0,2% para o rRNA16S, de 0% a 0,5% para o gene COI, de 0% a 2,4% para o gene Cyt *b* e de 0% a 0,7% para o TROP. Os níveis de divergência genética intra populacional variou de 0 a 0,9 %, evidenciando baixo índice de divergência genética e revelando um alto grau de similaridade, sugerindo a ocorrência de um único táxon para bacias Maranhenses e Amazônia. A amostra mostrou valores de *Fst* de baixo a moderados (rRNA16S - 0,06; COI - 0,41 e TROP - 0,09) exceto para o Cyt *b* que apresentou *Fst* com valor de 0,92. As árvores filogenéticas mostraram para todos os marcadores um clado fortemente suportado, onde os espécimes obtidos de *P. lacustris* das bacias Maranhenses e *P. nigricans* das bacias Amazônica agruparam-se fortemente com valores de *bootstrap* de 94 a 100%. Nossos resultados confirmam a alta similaridade genética entre os táxons *P. lacustris* e *P. nigricans* nas bacias estudadas apontando para uma revisão taxonômica no grupo.

Palavras Chaves: Taxonomia, DNA mitocondrial, DNA nuclear, Divergência genética.



## ABSTRAT

In the family Prochilodontidae, the genus *Prochilodus* constitutes an important fishing resource. The fish of this genus have very well preserved morphological characteristics, thus making it difficult to identify at the species level, generating uncertainties regarding the taxonomic status between *Prochilodus lacustris* and *Prochilodus nigricans*. The present work aimed to determine the indices of genetic variability of *Prochilodus* sp. in the main watersheds of the state of Maranhão, based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Sampling was made up of specimens from the main Maranhenses basins (Tocantins, Itapecuru, Mearim, Turiaçu, Pericumã and Parnaíba) and the Amazon Basin (Santarém, Cupari, Xingu, Jacareacanga, Itaituba) collected with different fishing gear, being identified according to with specific literatures and subsequent confirmation by specialist. The testimonial material (voucher) was deposited at the Museum of Zoology of the State University of Londrina / MZUEL and at the Laboratory of Genetics Molecular Biology of CESC / UEMA. Sample of tissue were removed and kept in 70% alcohol for genetic analysis. Total DNA extraction was performed from muscle tissue using the Wizard Genomic DNA Purification Promega Kit following manufacturer's instructions with some modifications. Isolation and amplification of the genes of interest were performed using the PCR technique using specific primers and subsequent sequencing. Sequences of *Hoplias malabaricus* (GU702203.1) and *Leporinus* sp. (FJ418763.1) obtained from GENBANK together with *Leporinus* sp. and *Hoplias malabaricus* obtained in the Laboratory of Genetics and Molecular Biology of the CESC / UEMA were incorporated as outgroup analyzes for the markers rRNA16S, TROP, COI and Cyt b. The BioEdit, DnaSPv6, MEGA 7, Harlequin 3.5 programs were used for the analysis. The results revealed 567bp sequences for the rRNA16S gene, 574bp for the COI gene, 839bp for the Cyt b 290pb gene for the TROP nuclear marker, and showed a strong genetic similarity between *P. lacustris* and *P. nigricans* with values of genetic divergence of 0% to 0.2% for rRNA16S, 0% to 0.5% for the COI gene, 0% to 2.4% for the Cyt b gene and 0% to 0.7% for TROP. The levels of intra-population genetic divergence varied from 0 to 0.9%, evidencing a low genetic divergence index and revealing a high degree of similarity, suggesting the occurrence of a single taxon for the Maranhenses and Amazon basins. The amova showed low to moderate Fst values (rRNA16S - 0.06, COI - 0.41 and TROP - 0.09) except for Cyt b which presented Fst with a value of 0.92. Phylogenetic trees showed for all markers a strongly supported clade, where the specimens obtained from *P. lacustris* from the Maranhenses and *P. nigricans* from the Amazon basins were strongly grouped with bootstrap values of 94 to 100%. Our results confirm the high genetic similarity between the *P. lacustris* and *P. nigricans* taxa in the studied basins, pointing to a taxonomic revision in the group.

Keywords: Taxonomy, mitochondrial DNA, nuclear DNA, genetic divergence.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Exemplar de *Prochilodus lacustris* (Steindachner, 1907) e exemplar de *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) 17
- Figura 2.** Genoma Mitocondrial (modificado a partir de MEYER, 1993) 19
- Figura 3.** Localização da área de coleta dos espécimes 23
- Figura 4.** Árvore haplotípica pelo modelo de Máxima verossimilhança (MV) com base no algoritmo de Tamura (1992) gene rRNA 16S do mtDNA, os números ao lado no ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima verossimilhança, Agrupamento de vizinhos, Máxima parcimônia 32
- Figura 5.** Árvore haplotípica pelo modelo de Máxima verossimilhança (MV) com base no algoritmo de Tamura (1992) gene COI do mtDNA, os números ao lado no ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima verossimilhança, Agrupamento de vizinhos, Máxima parcimônia 37
- Figura 6.** Árvore haplotípica pelo modelo de Máxima verossimilhança (MV) com base no algoritmo de Tamura (1992) gene *Cyt b* do mtDNA, os números ao lado no ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima verossimilhança, Agrupamento de vizinhos, Máxima parcimônia 43
- Figura 7.** Árvore haplotípica pelo modelo de Máxima verossimilhança (MV) com base no algoritmo de Tamura (1992) gene TROP, os números ao lado no ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima verossimilhança, Agrupamento de vizinhos, Máxima parcimônia 47
- Figura 8.** Árvore haplotípica concatenada pelo modelo de Máxima verossimilhança (MV) com base no algoritmo de Tamura (1992) gene rRNA 16S/COI e *Cyt b* do mtDNA, os números ao lado no ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima verossimilhança, Agrupamento de vizinhos, Máxima parcimônia 48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Espécimes de <i>prochilodus lacustris</i> e <i>Prochilodus nigricans</i> descritos pela literatura obtidos em bacias hidrográficas no estado do Maranhão.	25
<b>Tabela 2.</b>	Sequências e referências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais.	27
<b>Tabela 3.</b>	Descrição dos ciclos de cada região mitocondrial amplificada na PCR.	27
<b>Tabela 4.</b>	Sequências obtidas do banco de dados GenBank e geradas no laboratório Genbimol.	28
<b>Tabela 5.</b>	Níveis de diversidade Genética nas populações de <i>Prochilodus</i> sp. com base em sequências do gene rRNA 16S.	29
<b>Tabela 6.</b>	Distribuição dos 10 haplótipos encontrados para as populações de <i>Prochilodus</i> sp. em função das localidades com base no gene rRNA 16S.	30
<b>Tabale7.</b>	Sítios polimórficos nos haplótipos de <i>Prochilodus</i> sp. baseados em 567 pb do gene rRNA 16S.	30
<b>Tabela 8.</b>	Resultados da Amova nas Populações de <i>Prochilodus</i> sp. do gene rRNA 16S.	31
<b>Tabela 9.</b>	Percentual médio de divergência Nucleotídica em populações de <i>Prochilodus</i> sp. no gene rRNA 16S com base no modelo Kimura-2-Parâmetros.	32
<b>Tabela 10.</b>	Níveis de diversidade genética nas populações de <i>Prochilodus</i> sp. com base em sequências do gene COI.	33
<b>Tabela 11.</b>	Distribuição dos 22 haplótipos encontrados para as populações de <i>Prochilodus</i> sp. em função das localidades e com base no gene COI.	34
<b>Tabela 12.</b>	Sítios polimórficos nos haplótipos de <i>Prochilodus</i> sp. baseados em 574 pb do gene COI	35
<b>Tabela 13.</b>	Resultados da Amova nas Populações de <i>Prochilodus</i> sp. gene COI.	36
<b>Tabela 14.</b>	Percentual de divergência Nucleotídica baseado no modelo Kimura 2 parâmetros, entre haplótipos de <i>prochilodus</i> sp. com base gene COI	36
<b>Tabela 15.</b>	Identificação molecular dos haplótipos mais frequentes de <i>Prochilodus</i> sp. realizada através de comparações de sequências obtidas dos rios maranhenses com sequências disponíveis na plataforma BOLDSystems.	38
<b>Tabela 16.</b>	Níveis de diversidade genética nas populações de <i>Prochilodus</i> sp. com base em sequências do gene <i>Cytb</i> .	39
<b>Tabela 17.</b>	Distribuição dos 12 haplótipos encontrados para as populações de <i>Prochilodus</i> sp. em função das localidades e com base no gene <i>Cytb</i> .	40
<b>Tabela 18.</b>	Sítios Polimórficos nos haplótipos de <i>Prochilodus</i> sp. baseados em 839 pb.	41
<b>Tabela 19.</b>	Resultado da Amova nas Populações de <i>Prochilodus</i> sp. gene <i>Cyt b</i> .	42

<b>Tabela 20.</b>	Percentual de divergência Nucleotídica baseado no modelo Kimura 2 parâmetros, entre haplótipos de <i>prochilodus</i> sp. com base em sequências do gene <i>Cytb</i> .	<b>43</b>
<b>Tabela 21.</b>	Níveis de diversidade genética nas populações de <i>Prochilodus</i> sp. com base em sequências de gene TROP.	<b>44</b>
<b>Tabela 22.</b>	Distribuição dos 17 haplótipos encontrados para as populações de <i>Prochilodus</i> sp. em função das localidades e com base no gene TROP.	<b>45</b>
<b>Tabela 23.</b>	Resultados da Amova nas Populações de <i>Prochilodus</i> sp. gene TROP.	<b>46</b>
<b>Tabela 24.</b>	Percentual de divergência Nucleotídica baseado no modelo Kimura 2 parâmetros, entre haplótipos de <i>prochilodus</i> sp. com base no gene TROP.	<b>47</b>

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>15</b>
<b>2. Fundamentação Teórica</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Aspectos taxonômicos</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Biologia e Distribuição</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Variabilidade Genética</b>	<b>19</b>
<b>2.3.1 Metodologias Moleculares</b>	<b>19</b>
<b>2.3.2 DNA Mitocondrial: rRNA16S, COI, Cyt <i>b</i></b>	<b>20</b>
<b>2.3.3 DNA Nuclear: TROP</b>	<b>20</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Geral</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Específicos</b>	<b>22</b>
<b>4. Metodologia</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Caracterização da área de estudo</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Coleta</b>	<b>24</b>
<b>4.3 Extração, Visualização e Diluição do DNA Genômico</b>	<b>26</b>
<b>4.4 Amplificação e Sequenciamento de DNA (rRNA 16S, COI, Cyt <i>b</i> e TROP)</b>	<b>26</b>
<b>4.5 Análise de dados</b>	<b>27</b>
<b>5. Resultados rRNA 16S, COI, Cyt <i>b</i> e TROP</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Gene rRNA 16S</b>	<b>29</b>
<b>5.1.1 Análise do fragmento e Diversidade Genética</b>	<b>29</b>
<b>5.1.2 Estrutura populacional e Análise molecular de variância</b>	<b>31</b>
<b>5.1.3 Análises filogenéticas e Distancia genética</b>	<b>31</b>
<b>5.2 Gene Citocromo Oxidase I (COI)</b>	<b>33</b>
<b>5.2.1 Análise do fragmento e Diversidade Genética</b>	<b>33</b>
<b>5.2.2 Estrutura populacional e Análise molecular de variância</b>	<b>36</b>
<b>5.2.3 Análises filogenéticas e Distancia genética</b>	<b>36</b>
<b>5.2.4 Identificação dos espécimes no BOLD System (The Barcord of life data system)</b>	<b>37</b>
<b>5.3 Gene Cyt <i>b</i></b>	<b>39</b>

<b>5.3.1</b>	<b>Análise do fragmento e Diversidade Genética</b>	<b>39</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Estrutura populacional e Analise molecular de Variância</b>	<b>42</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Análises filogenéticas e Distancia genética</b>	<b>42</b>
<b>5.4</b>	<b>Gene TROP</b>	<b>44</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Análise do fragmento e Diversidade Genética</b>	<b>44</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Estrutura populacional e Analise molecular de variância</b>	<b>46</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Análises filogenéticas e Distancia genética</b>	<b>46</b>
<b>5.5</b>	<b>Analise dos dados concatenados</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>Discussão</b>	<b>49</b>
<b>6.1</b>	<b>Identificação Molecular</b>	<b>49</b>
<b>6.2</b>	<b>Diversidade Genética</b>	<b>50</b>
<b>6.3</b>	<b>Estruturação Populacional</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão</b>	<b>53</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>54</b>
	<b>Anexo</b>	<b>61</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A ictiofauna de água doce neotropical é uma das mais ricas de todo o planeta. De acordo com Reis et al. (2016), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas para o planeta, aproximadamente 6.000 encontram-se na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente. Os peixes do gênero *Prochilodus* estão entre os mais distintos, abundantes, e difundidos em água doce na América do Sul, com tamanho do corpo variando de médio a grande porte, ocasionalmente alcançando 80 cm de comprimento (SIVASUNDAR et al., 2001; GODINHO, 2005; ORTI et al., 2008 ; PAULA, 2006; ESCHMEYER, 2018) .

Os peixes da família Prochilontidae inclui em três gêneros (*Ichtyolephas*, *Semaprochilodus* e *Prochilodus*) e cerca de 21 espécies válidas (PIORSKI, 2010), com importante participação na constituição da fauna dos rios neotropicais. Esta família encontra-se amplamente distribuída na América do Sul, com ocorrência registrada em todas as bacias hidrográficas da região. Estudos genéticos com essa família utilizaram espécies de *Prochilodus* das bacias do Paraná, Amazonas, Orinoco e Magdalena mostraram que cada bacia abrigava um grupo monofilético de linhagens mitocondriais, suportada por uma revisão taxonômica da família, das espécies reconhecidas para o gênero que apresenta distribuição restrita a uma única drenagem (CASTRO; VARI, 2004).

Estudos morfológicos e moleculares mostram espécies *Prochilodus lacustris* e *Prochilodus nigricans* como um grupo não monofilético, sendo seu morfotipo pouco variável quando comparamos exemplares das Bacias Amazônicas e as Maranhenses (SILVA et al., 2008), destacando assim a importância de novos estudos para sanar a incerteza taxonômica dessas espécies dentro dessas bacias. Na distribuição geográfica das *Prochilodus*, a espécie *Prochilodus nigricans* (AGASSIZ, 1829) está amplamente distribuída ao longo do leito principal do Rio Amazonas, bem como nos afluentes a oeste e sul do Rio Amazonas e também na bacia do Rio Tocantins. São conhecidos por se mover de águas claras para águas mais escuras, é uma espécie de grande importância comercial na região sendo uma das principais espécies exploradas para o consumo regional na Amazônia (BATISTA, 1998). A espécie *Prochilodus lacustris* (STEINDACHNER, 1907) está distribuída ao longo da América do Sul, é uma espécie endemicamente citadas para as bacias do Rio Parnaíba e na bacia do Rio Mearim, bacia

do Rio Itapecuru sendo uma espécie de médio porte, caracterizada pela grande importância e econômica nessas regiões (PIORSKI, 2007).

Estudos filogenéticos, utilizando dados de sequência de DNA com representantes da ordem Characiformes tiveram início em 1996 com a publicação de um estudo sobre a filogenia das piranhas e pacus (ORTÍ; MEYER, 1996), sugerindo assim a existência de um padrão de relacionamento ainda não conhecido para o grupo. Tendo em vista que esse grupo de peixes é de difícil interpretação, as ferramentas moleculares simultaneamente com a análises morfológicas ajudam a esclarecer as dúvidas geradas dentro de cada grupo (VARI, 1983; SIDLAUSKAS, 2008; OLIVEIRA et al., 2011; DILLMAN et al., 2015), em outros casos, o estudo molecular e as hipóteses morfológicas discordam (ZANATA; VARI, 2005; ARROYAVE; STIASSNY, 2011).

Os estudos moleculares têm um papel importante para esclarecer estes problemas de identificação, pois são capazes de mostrar a diversidade genética presente dentre os grupos (TURNER et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; LOPERA-BARRERO et al., 2013). O aparecimento dessa técnica, permitiu novos meios para realizar estudos taxonômicos, além de permitir desvendar mudanças evolutivas, possibilitando assim entender melhor as relações genéticas entre espécies distintas e dentro das espécies (PONZETTO; STRUBE, 2011).

Os marcadores moleculares revelam a história da divergência populacional e dispersão das espécies sendo tais conhecimentos úteis para estudos de manejo e conservação e de exploração econômica (DALIA, 2011). Um conhecimento mais profundo sobre a estrutura e variabilidade genética das espécies é necessário para melhorar os programas de manejo e conservação da *Prochilodus* sp.

Dessa forma considerando que a identificação correta das espécies é o primeiro passo para o sucesso de qualquer programa de manejo e conservação de recursos pesqueiros, propõe-se o uso de sequências dos genes rRNA16S, Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), Citocromo *b* (Cyt *b*) e Alfa-tropomiosina (TROP) para identificar e estimar os níveis de variabilidade genética na tentativa de esclarecer o status taxonômico de *Prochilodus* sp. nas bacias hidrográficas do estado do Maranhão.



## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

### 2.1 Aspectos Taxonômicos

A classificação taxonômica do gênero *Prochilodus* segue a recomendada por Castro; Vari, 2004.

REINO: *Animália*

FILO: *Chordata*

CLASSE: *Actinopterygii*

ORDEM: *Characiformes*

FAMILIA: *Prochilodontidae*

GÊNERO: *Prochilodus*  
(CASTRO; VARRI, 2004)

**Figura 1:**Exemplar de *Prochilodus lacustris* (Steindachner, 1907) e Exemplar de *Prochilodus nigricans* (Agassiz,1829)



Fonte:Cleydson Gomes



Fonte: Google

Os Prochilodontidae (Characiformes) constituem cerca de 50 a 60% da biomassa de peixes em rios neotropicais (TAPHORN, 1992) incluindo três gêneros (*Ichthyolephas*, *Semaprochilodus* e *Prochilodus*) e cerca de 21 espécies válidas. O gênero *Prochilodus* está amplamente distribuído em 13 famílias (CASTRO; VARI, 2004). No Brasil essa espécie encontra-se distribuídas por quase todas as bacias hidrográficas e são popularmente conhecidas como curimatá ou curimatã (ARAÚJO et al., 2003; GARCIA et al., 2009).

A taxonomia restringe a maior parte das espécies a uma única bacia e devido à sua alta fecundidade, cada bacia teria apenas uma única população panmítica. Assim essa hipótese, por sua vez, permite que estas espécies sustentem muitos sistemas fluviais sul-americanos (BAYLEY; PETRERE JÚNIOR, 1989; RIBEIRO; PETRERE, 1990; CAMARGO; PETRERE, 2001; GARCIA et al., 2009).

## 2.2 Biologia e Distribuição

A curimatã é um peixe de grande a médio porte, podendo atingir até 80cm, este gênero se diferencia dos demais por possuir o corpo comprimido e alto, a cabeça larga, possui a cor cinza-esverdeada, sendo seu corpo mais escuro que seu dorso, clareando no ventre que é prateado com escamas ctenóides (CASTRO ; VARI, 2004). Prefere ambientes lóticos e locais de águas mais lentas, são espécies detritívoras e iliófas (PETRERE JÚNIOR, 1989). Possuem características reprodutivas em comuns tais como a desova total e alta fecundidade, fecundação externa e ausência do cuidado parental (LOWE-MCCONNELL, 1999).

Na porção norte brasileira, mais precisamente no estado do Maranhão, os *Prochilodus* apresentam alta abundância na rede hidrográfica do Estado e se caracterizam como um gênero importante no aspecto econômico e ecológico. Com destaque para a espécie *Prochilodus lacustris* (STEINDACHNER, 1907) que é endêmica nas bacias maranhenses dos rios Parnaíba, Mearim (PIORSKI, 2007; 2010). *Prochilodus nigricans* possui uma área de ocorrência ao longo do Rio Amazonas, bem como nos tributários à também na bacia do Rio Tocantins (CASTRO; VARI, 2004). Segundo a hipótese de dispersão costeira, espécies Amazônicas (*Prochilodus nigricans*) teriam colonizados os rios Maranhenses através de rotas estabelecidas ao longo da costa durante as fases regressivas do mar (MONTROYA-BURGOS, 2003). Recentemente Hubert; Renno, (2006) analisaram dados de distribuição da ordem characiformes e chegaram à conclusão da existência de uma área de refúgio no Rio Parnaíba, onde as

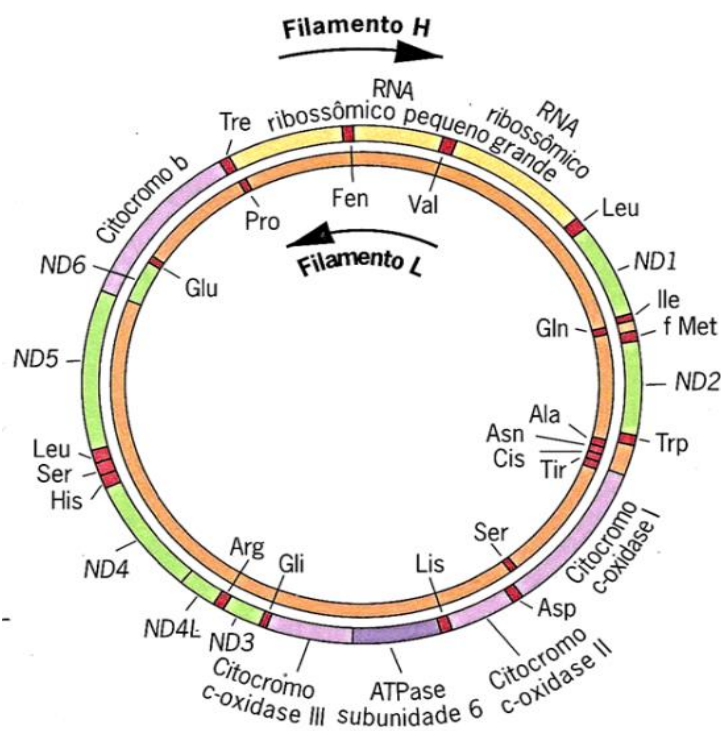
espécies eram isoladas durante as transgressões mais intensas, recolonizando as áreas mais próximas quando o mar regrediu. Em ambos os casos o mar seria o fator postulado como principal responsável pela diversificação nos rios do Maranhão.

## 2.3 Variabilidade Genética

### 2.3.1 Metodologias Moleculares

O DNA mitocondrial (mtDNA) animal é constituído de uma molécula pequena de fita dupla circular que codifica aproximadamente 5% de toda dispositivo necessário para o funcionamento da mitocôndria (NAHUM, 2001). Seu tamanho é de aproximadamente 16.500 pares de base (pb), onde são descritos 37 genes, dos quais 13 codificam proteínas, 2 codificam RNAs ribossômicos e 22 codificam RNAs transportadores (MEYER, 1993) ( Figura 2).

**Figura 2:** Genoma mitocondrial (modificado a partir de MEYER, 1993).



Estudos dessa natureza são amplamente realizados para a caracterização genética, e avaliação da estrutura dos estoques de peixes em várias regiões do mundo (ANNE, 2006; ORTI et al., 2008; IERVOLINO et al., 2010; MELO, 2011; PIORSKI, 2010; BORBA et al., 2013; MELO et al., 2016; FRABLE et al., 2016).

### 2.3.2 DNA Mitocondrial: rRNA 16S, COI, *Cyt b*

O gene 16S rRNA faz parte da grande subunidade ribossomal do DNA mitocondrial assim como o 12S rRNA (PALUMBI, 1996) sendo bastante conservado, apresentando uma evolução lenta e tem se mostrado como um bom marcador na diferenciação de peixes, como também em estudos comparativos interespecífico e intergenéricos (SANTOS et al., 2003; CALCAGNOTTO al., 2005; FRAGA et al., 2014).

O gene Citocromo *b* (*Cyt b*) tem sido bastante utilizado em análises de táxons que divergiram recentemente tais como populações e espécies (FARIAS et al., 2001; SANTOS et al., 2003) esse gene contém sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos, sendo eficaz para caracterização genética das espécies.

Outra ferramenta bastante promissora é o DNA barcode proposta por Hebert et al. (2003), consiste em um segmento do DNA mitocondrial equivalente a 680 pb do gene Citocromo Oxidase I (COI). Esse fragmento tem se mostrado eficaz em identificar espécies de aves, borboletas, peixes, moscas e muitos outros grupos de animais (WARD et al., 2005; HUBERT; RENNO, 2006; IVANOVA et al., 2007). A eficiência do sistema barcode foi demonstrada pela identificação de várias espécies de peixes marinhos e de água doce com uma taxa de sucesso de mais 90% (PEREIRA et al., 2013).

Nesse sentido, dados moleculares têm sido cada vez mais empregados em estudos populacionais na identificação de espécies e níveis superiores. As abordagens genéticas contribuem com informações quando o uso de características morfológicas na taxonomia é dificultado por espécies potencialmente crípticas ou de extrema variabilidade fenotípica (LOVEJOY; ARAÚJO, 2000).

### 2.3.3 DNA Nuclear: TROP

O gene Alfa-tropomiosina (TROP) é responsável pela produção de uma proteína a “ tropomiosina”, que tem sido utilizado em alguns estudos filogenéticos, mostrando a utilidade e eficácia deste gene em diversos grupos de peixes permitindo o comparar os grupos com divergências recentes (CALCAGNOTTO et al., 2005; AVELINO et al., 2015).

Em estudos com a espécie *Prochilodus lacustris* feito por Silva et al. (2008) foi encontrando um único haplótipo para os espécimes da bacia do rio Itapecuru que agrupou fortemente com a sequência depositas no GENBANK de *Prochilodus nigricans* de ocorrência na Amazônia, com 0% de divergência genética, mostrando assim uma problemática na sistemática do grupo quanto a incertezas taxonômicas entre *Prochilodus lacustris* x *Prochilodus nigricans*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Determinar os índices de variabilidade genética de *Prochilodus* sp. nas principais bacias hidrográficas do estado do Maranhão, com base em sequências do DNA mitocondrial e nuclear.

#### **3.2 Específicos**

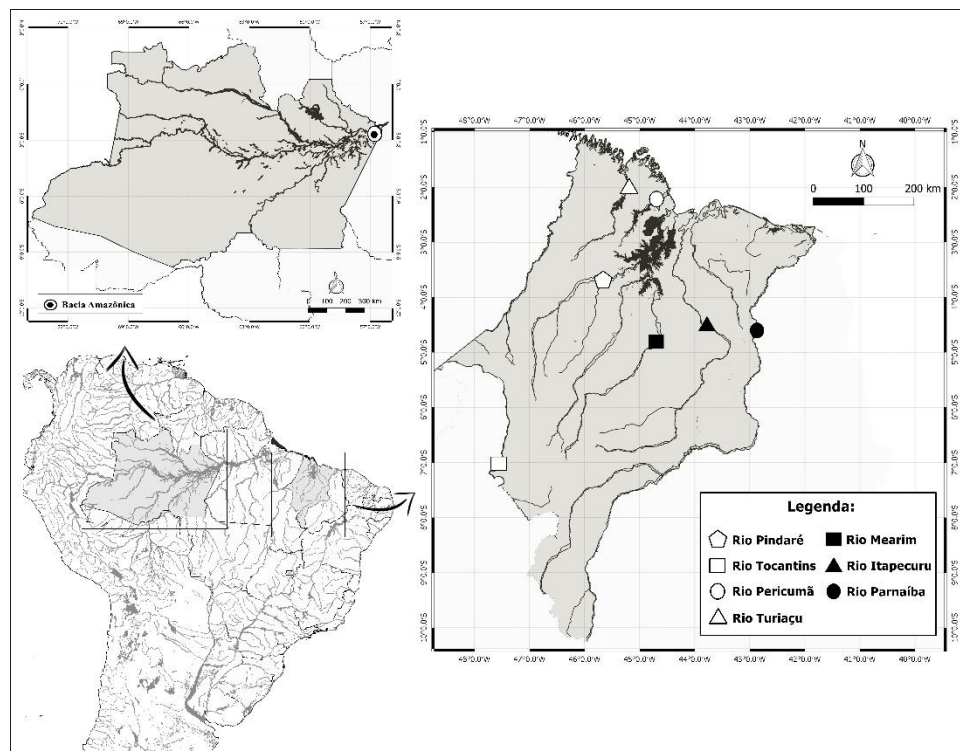
- Determinar os índices de divergência genética nos estoques de *Prochilodus* sp. por meio dos genes COI, rRNA 16S, Cyt *b* e TROP;
- Identificar as espécies utilizando o gene Citocromo Oxidase I (COI) e comparar com as depositadas BOLD SYSTEMS (The Barcode of Life Data System);
- Testar a ocorrência de diferenciação e estruturação entre as populações analisadas;
- Contribuir no esclarecimento das incertezas taxonômicas no grupo.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Caracterização da área de estudo

O estado do Maranhão é detentor de grande potencial hídrico no país possuindo dez bacias hidrográficas e mais dois sistemas hidrográficos. As bacias hidrográficas que banham o estado em sua maioria pertencem à bacia do Norte e Nordeste, e ocupa uma área de 981.661Km<sup>2</sup> (TEIXEIRA; SOUZA FILHO, 2009; PIORSKI, 2010). O estado representa uma área de transição entre o semiárido nordestino e a floresta amazônica abrigando uma rica hidrografia de rios perenes como Parnaíba, Itapecuru, Mearim e Pindaré (PIORSKI, 2010). Nesse estudo foram utilizadas as Bacia do Itapecuru - MA, Mearim - MA, Parnaíba - MA, Tocantins - MA e Bacia do Amazonas (Santarém, Cupari, Xingu, Jacareacanga, Itaituba), e os Rios Pindaré, Pericumã e Turiaçu (Figura 3).

**Figura 3:** Localização da área de coleta dos espécimes.



Adaptado pelo Autor

A bacia do Rio Itapecuru situa-se na parte centro-leste do Estado do Maranhão, entre as coordenadas 2° 51' a 6° 56' Latitude S e 43° 02' a 43° 58' Longitude W, com aproximadamente uma área de 52.972,1 km<sup>2</sup> (SUDENE, 1997). A bacia do rio Parnaíba nasce na chapada das Mangabeiras (10°15'S 45° 50W) e desemboca em forma de delta

entre as baías do Caju e das Canárias (2°21'S 43°55'W), após um percurso de aproximadamente 1.400km, atravessando os estados do Maranhão e Piauí (CODEVASF, 2010). A bacia do rio Mearim genuinamente maranhense, tem suas nascentes nas encostas setentrionais da Serra da menina, em altitudes de 400 a 500m aproximadamente, entre as coordenadas 3°18'S 44°48'W, com um curso de aproximadamente 930km (IBGE, 2010) . A bacia do rio Pindaré, nasce na serra do Gurupi (5°49' S 46°53'W) e tem curso de aproximadamente 680 km (BRASIL, 2006). A partir de Alto Alegre do Pindaré, o rio torna-se meandrante formando grandes lagos na região da Baixada Maranhense, tais como Viana e Penalva (PIORSKI, 2010). A bacia hidrográfica do Rio Turiaçu é considerada secundária (possui um afluente que irá desembocar no rio principal), situa-se na porção ocidental do território maranhense. Reúne rios de trajetos curtos, mas bastantes caudolosos e picosos, que apresentam características amazônicas e sofrem constante influência das marés (BELCHIOR et al., 2017).

A bacia do rio Tocantins nasce no Planalto de Goiás, a cerca de 1000m de altitude, sendo formado pelos rios das Almas e Maranhão, com extensão total aproximada de 1.960km até sua foz no Oceano Atlântico (MMA, 2006). O trecho inferior tem início próximo a cidade de Marabá-PA, logo após o rio construir os limites entre o Maranhão, Pará e Tocantins. O Rio Pericumã localizada na Microrregião da Baixada Maranhense, o principal rio da Bacia do Pericumã é o rio de mesmo nome. Localiza-se na porção Noroeste do Maranhão entre as coordenadas 2°02' a 3°07' de latitude sul e entre os meridianos 44°30' a 45°30' oeste de Greenwich. A rede hidrográfica tem predominância do padrão dendrito, constituída de rios, em geral, intermitentes ou rios de chuvas ( BRASIL, 2006; SILVA, 2007; IBGE, 2010; SILVA et al., 2017; VIEGAS et al., 2014).

## **4.2 Coleta**

A amostragem foi constituída de espécimes coletados no curso dos rios Itapecuru, Pindaré, Mearim, Turiaçu, Parnaíba, Tocantins, Pericumã e Amazonas (Tabela 1). Para cada coleta foram utilizados apetrechos de pesca como rede de arrasto, malhadeiras de diferentes aberturas e tarrafas. Para identificação taxonômica utilizou-se literatura científica (BRITSKI et al., 1999; SANTOS et al., 2004; SOARES, 2005; SANTOS et al., 2006; PIORSKI et al., 2007) e posterior confirmação por especialista. O material testemunho (voucher) de cada uma das bacias foi depositado no Museu de



Zoologia da Universidade Estadual de Londrina–MZUEL e o restante dos espécimes foram depositados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão CESC/UEMA. As coletas realizaram-se mediante a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis e pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade e conservação (n°. 02012.004159/2006 - Rio Itapecuru, ICMBIO n°. 46367-1 - Rio Pindaré, Rio Turiaçu, Rio Pericumã, ICMBIO - MMA n° 42.119-2 - Rio Mearim). Em nossas análises foram incluídas amostras de tecidos de espécies provenientes da bacia amazônica, que se encontravam depositados no Laboratório de Genética e Biologia molecular (GENBIMOL) do CESC/UEMA.

**Tabela 1.** Espécimes de *Prochilodus lacustris* e *Prochilodus nigricans* descritos pela literatura obtidos em bacias hidrográficas no estado do Maranhão.

<b>Bacias Hidrográficas</b>	<b>Táxons</b>	<b>N° Amostral</b>	<b>Voucher</b>	<b>Coordenadas</b>
Bacia do Itapecuru	<i>P. lacustris</i>	26	MZUSP 104603	03°31'39"S 44°24'19"W
Bacia do Mearim	<i>P. lacustris</i> / <i>P. nigricans</i>	42	MZUSP634/ COFAUMA300	3° 27' 54.3" S 44° 52' 11.4" W
Rio Pindaré	<i>P. lacustris</i>	10	MZUEL 17383	3° 39' 14.36" S 45° 25'
Rio Pericumã	<i>P. lacustris</i>	06	MZUEL 17355	02° 31' 17" S 45° 04' 57" W
Rio Turiaçu	<i>P. lacustris</i>	09	MZUEL 17428	02° 15' 49" S 45° 19' 24" W
Rio Parnaíba	<i>P. lacustris</i>	18		04°15'24"S 43°00'46"W
Bacia Tocantins	<i>P. nigricans</i>	08	-	06°33'38" S 47°27'04" W
Bacia do Amazonas	<i>P. nigricans</i>	17	-	02°26'34" S54°42'28" W
<b>Total</b>		<b>136</b>		-

### 4.3 Extração, Visualização e Diluição do DNA Genômico

O DNA total foi extraído utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification Promega seguindo instruções do fabricante com algumas modificações (Anexo I). A qualidade do DNA foi verificada por meio de uma eletroforese em gel de agarose a 1% (TBE 1X pH= 8.0 e 0.1 de Red.) em uma proporção de 3 µl do corante azul de Bromofenol (5ml de glicerol, 1ml de Azul de Bromofenol a 0.1%, 1ml de xilenocianol a 0,1%, 2ml de EDTA a 0,5M) para 5 µl de DNA. As amostras foram conservadas em freezer a -20°C.

### 4.4 Amplificação e Sequenciamento de DNA (rRNA 16S, COI, Cyt *b* e TROP)

O isolamento e amplificação das regiões genômicas rRNA 16S, COI, Cyt *b* e TROP foi realizado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando-se *primers* específicos (Tabela 2 e 3). A PCR foi feita em um volume final de 25 µl, com os seguintes reagentes: 4 µl de DNTPs (1.25 M) (nucleotídeos), 2.5 µl de Buffer (10X), 0.5 µl de solução de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl de DNA (250 ng/µl), 0.25 µl de cada primer (200 ng/µl), 0.2 µl da enzima Taq polimerase (5U/µl) e 16.3 de H<sub>2</sub>O purificada. Os parâmetros de amplificação de cada região mitocondrial encontram-se na tabela 3.

Os produtos das PCRs foram visualizados em gel de agarose a 1% e purificados com ExoSAP-IT segundo o protocolo sugerido pelo fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada pelo método de Sanger et al. (1977) com o Kit ABI Prism™ Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Reading Reaction (Applied Biosystems). As amostras foram precipitadas em EDTA-Acetato de Sódio-Etanol e analisadas no sequenciador de DNA automático (ABI 3500/Life Technologies).

**Tabela 2.** Sequências e referências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>	<b>Referências</b>
<b>rRNA 16S</b>		
16SL1 (forward)	‘5GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC3’	Palumbi <i>et al.</i> , (1991).
16SH2 (reverse)	‘5CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3’	
<b>Citocromo Oxidase I</b>		
COIF1 (forward)	‘5TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3’	Ward <i>et al.</i> , (2005)
COIR1 (reverse)	‘5TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3’	
<b>Citocromo b</b>		
L14725 (forward)	‘5CGAAACTAATGACTTGAAAAACCACCC CGTTG3’	Santos <i>et al.</i> , (2003)
MVZ16 (reverse)	‘5AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT3 ,’	Smith e Patton, (1993)
<b>TROP</b>	1’5GAGTTGGATCGGGCTCAGGAGCG3’ 2’5CGGTCGGCCTCTTCACAATGTGCTT3’	Friesen <i>et al.</i> , (1999)

**Tabela 3.** Descrição dos ciclos de cada região mitocondrial amplificada na PCR.

<b>Primers</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>
rRNA 16S	30	94°C/30 s	50°C/1 min	72°C/2 min
COI	35	94°C/1 min	50°C/30 s	72°C/1 min
Cyt B	30	94°C/30 s	51°C/1 min	72°C/2 min
TROP	30	95°C/30s	60°C/30s	72°C/45s

#### 4.5 Análise de Dados

As sequências foram editadas e alinhadas manualmente no software BIOEDIT 7.0 (HALL, 1999), foram usadas como referência no alinhamento e nas análises de *Prochilodus nigricans* do GENBANK (AY788075-FJ944755-HQ623625 para o gene rRNA16S; JN032685-JN032687 para o gene COI; KX086838.1 para o gene Cytb e AY817278.1 para o gene TROP).

O programa MEGA 7.0 (TAMURA et al., 2013) foi usado para gerar a matriz de distância genética entre os espécimes das bacias analisadas, foram utilizados o modelo evolutivo de Tamura-3-parâmetro (T92+G+I) (TAMURA, 1992) e os método de Máxima Verossimilhança (MV), Agrupamento por vizinhos (NJ), Máxima Parcimônia (MP) para a construção. Sequências de *Hoplias malabaricus* (GU702203.1)

e *Leporinus* sp. (FJ418763.1) obtidas do GENBANK foram incorporadas na análise para o gene COI. Foram utilizadas sequências de *Hoplias malabaricus* e *Leporinus* sp. contidas no banco de dados do Laboratório GENBIMOL, como outgroup para os genes rRNA16S, TROP e COI (Tabela 4).

Os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica para cada população foram gerados no programa DnaSP 6.0 (LIBRADO; ROZAS, 2009). O índice de fixação ( $F_{ST}$ ) foi obtido através de 1023 permutação aleatórias. A AMOVA e índices de fixação foram obtidos através do programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

A divergência nucleotídica entre e dentro das populações foram determinadas pela distância p não corrigida (rRNA16S, COI, *Cytb*) e pelos parâmetros corrigida de Tamura; Nei (1993) (rRNA 16S e *Cytb*) e Kimura 2-parâmetros (COI) no MEGA 7.0. Foi feita a comparação das sequências nucleotídica obtidas neste estudo com as sequências já depositadas no banco de dados do BOLDSYSTEMS v.3 (*The Barcode of life Data System-[www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)*) (RATNASINGHAM; HERBERT, 2007).

As sequências dos marcadores COI, *Cyt b*, e rRNA 16S foram concatenados no programa Mesquite 2.75 (MADDISON; MADDISON, 2011), para se efetuar uma análise filogenética unificada do conjunto de dados compostos pelos três fragmentos.

**Tabela 4.** Sequências obtidas do banco de dados GenBank e geradas no laboratório Genbimol.

Espécie	Código de acesso (GenBank) e Referência			
	rRNA 16S	COI	<i>Cytb</i>	TROP
<i>Hoplias malabaricus</i>	GENBIMOL	GU702203.1 GENBIMOL	JF801035.1	AY817242.1 GENBIMOL
<i>Leporinus</i> sp	GENBIMOL	FJ418763.1 GENBIMOL	GENBIMOL	GENBIMOL
<i>Prochilodus nigricans</i>	AY788075- FJ944755- HQ623625	JN032685- JN032687	KX086838.1	AY817278.1

## 5. RESULTADOS rRNA 16S / COI/ Cyt *b* /TROP

### 5.1 GENE rRNA 16S

#### 5.1.1 Análise do fragmento e Diversidade Genética

O sequenciamento do gene rRNA16S do DNA mitocondrial de 106 indivíduos da espécie *Prochilodus* sp. resultou em um fragmento de 567 pb com 558 sítios conservados, nove sítios polimórficos e seis sítios informativos para parcimônia. A composição nucleotídica constituiu-se de 30,8% para adenina, 23,5% de citosina, 23,7% de guanina e 22% para timina. Dentre todas as sequências foram encontradas 10 haplótipos e valores de diversidade haplotípica e nucleotídica  $h=0,309$  e  $\pi =0,00079$  respectivamente, quando as populações foram consideradas separadamente os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica variaram como observado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Níveis de diversidade Genética nas populações de *Prochilodus* sp. com base em sequencias do gene rRNA 16S.

Populações	N	NH	S	Índices de Diversidade Molecular	
				h	$\pi$
Bacia do Amazonas	17	1	0	0,000	0,00000
Bacia Itapecuru	21	3	2	0,186	0,00049
Bacia Mearim	25	6	6	0,533	0,00188
Bacia Parnaíba	13	3	2	0,603	0,00118
Bacia Pericumã	4	2	1	0,667	0,00118
Bacia Pindaré	10	1	0	0,000	0,00000
Bacia Tocantins	8	1	0	0,000	0,00000
Bacia Turiaçu	8	1	0	0,000	0,00000
<b>Populações Agrupadas</b>	<b>106</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>0,309</b>	<b>0,00079</b>

N= número amostral, NH= número de haplótipos,  $h$ = diversidade haplotípica S= Sítios polimórficos  $\pi$ = diversidade nucleotídica.

Do total de 10 haplótipos encontrados, os haplótipos H4 a H8, foram exclusivos para a bacia do Mearim, o H5 foi compartilhado entre as bacias do Mearim e Pericumã, o haplótipos H9 e H10 foi exclusivo para a bacias do Parnaíba. O haplótipo H1 mostrou-se mais frequente ocorrendo em todas as bacias hidrográficas do estado, observamos assim que o haplótipo H1 compreende tanto os espécimes identificados como *Prochilodus nigricans* oriundos da bacia do Amazonas quanto *Prochilodus lacustris* oriundos das bacias Maranhenses, conforme mostra as Tabelas 6 e 7.

**Tabela 6.** Distribuição dos 10 haplótipos encontrados para as populações de *Prochilodus* sp. em função das localidades com base no gene rRNA 16S.

Haplótipos	Amaz	Ita	Mea	Parna	Per	Pin	Toc	Tur	Total
H1	17	19	17	7	2	10	8	8	88
H2	-	1	-	-	-	-	-	-	1
H3	-	1	-	-	-	-	-	-	1
H4	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H5	-	-	2	-	2	-	-	-	4
H6	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H7	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H8	-	-	3	-	-	-	-	-	3
H9	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H10	-	-	-	5	-	-	-	-	5
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>25</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>106</b>

Amaz=Amazonas, Ita=Itapecuru, Mea=Mearim, Parna=Parnaíba, Pin=Pindaré, Toc=Tocantins, Tur=Turiaçu.

**Tabela 7.** Sítios polimórficos nos haplótipos de *Prochilodus* sp. baseados em 567 pb do gene rRNA 16S.

HAPLOTIPOS	SÍTIOS										POPULAÇÕES
	3	7	4	7	3	2	9	1	3		
H1	C	C	G	A	A	A	C	G	C		AMAZ/ITA/MEA/PARNA/PER/PIN/TOC/TUR
H2	.	.	.	G	.	.	.	.	.		ITA
H3	.	.	.	G	.	.	.	A	.		ITA
H4	.	.	.	.	.	.	A	.	.		MEA
H5	.	G	.	.	.	.	.	.	.		MEA/PER
H6	G	G	.	.	.	T	.	.	.		MEA
H7	G	.	.	.	.	T	.	.	.		MEA
H8	.	.	A	.	G	.	.	.	.		MEA
H9	.	.	.	.	.	.	.	.	A		PARNA
H10	.	.	.	.	G	.	.	.	.		PARNA

Amaz=Amazonas, Ita=Itapecuru, Mea=Mearim, Parna=Parnaíba, Per=Pericumã, Pin=Pindaré, Toc=Tocantins, Tur=Turiaçu

### 5.1.2 Estrutura Populacional e Análise Molecular de Variância

O teste de amova mostrou que a maior variação ocorreu dentro das populações e dos grupos com  $F_{st}$  e Valores de  $p$  significativos para as populações maranhenses (Tabela 8).

**Tabela 8 .** Resultados da Amova nas Populações de *Prochilodus* sp. do gene rRNA 16S.

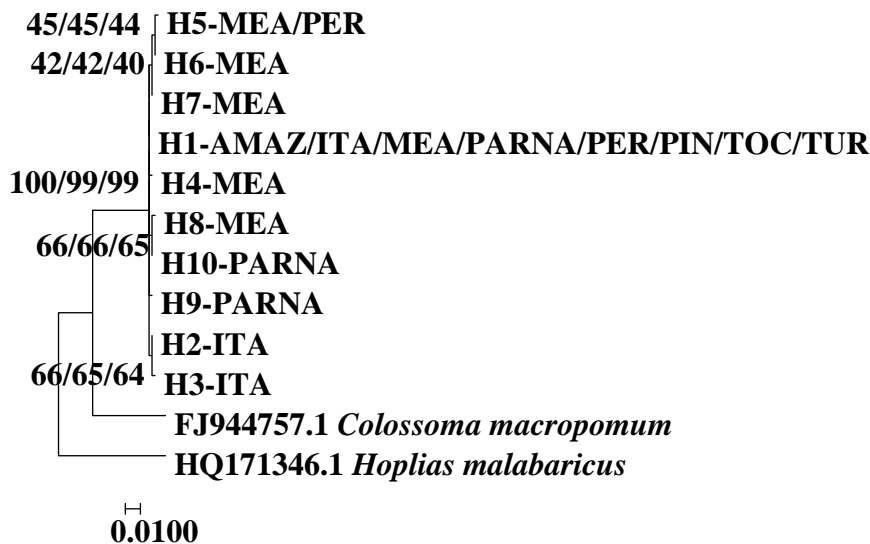
<b>Tipos de Variação</b>	<b>Componentes de variação</b>	<b>% Total de Variação</b>	<b><math>F_{st}</math> Estatístico</b>	<b>P*</b>
<b>Grupo Maranhão (Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba, Turiaçu)</b>				
Dentro das Populações	0.22539	89.37	0.10633	<0,0001
Entre as Populações	0.02682	10.63		
<b>Dois grupos (rios maranhenses e Amazonas)</b>				
Dentre os Grupos	0.18859	93.82	0.06178	<0,0001
Entre populações dentro do grupo	0.02987	14.86		
Entre os Grupos	-0.01745	-8.68		

\*valores de  $p$ , calculados aleatoriamente com 1023 permutações.

### 5.1.3 Análises filogenéticas e Distância Genética

A reconstrução filogenética de haplótipos baseada em três métodos (Máxima parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV) e Neighbour-Joining (NJ) gerou topologias similares, agrupando fortemente os exemplares de *Prochilodus lacustris* com 100% de *bootstrap* para Máxima Parcimônia e 99% de *bootstrap* para máxima verossimilhança e Neighbour-Joining, confirmando, portanto, a monofilia para os espécimes analisados (Figura 4).

**FIGURA 4:** Árvore haplotípica de Máxima verossimilhança (MV) com base no algoritmo de Tamura (1992) para o gene rRNA 16S do mtDNA, os números ao lado no ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima Verossimilhança, Agrupamento de Vizinhos e Máxima Parcimônia.



A matriz de distância genética com base no gene rRNA 16S revelou índices de diferenciação interpopulacional e intra populacional variando de 0 a 0,2%, entre as duas espécies em estudo (Tabela 9).

**Tabela 9.** Percentual médio de divergência Nucleotídica em populações de *Prochilodus* sp. no gene rRNA 16S com base no modelo Kimura 2 Parâmetros.

POPULAÇÕES	Divergência Genética							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1.Bacia do Amazonas	<b>0,0</b>							
2.Bacia Itaipuru	0,0	<b>0,1</b>						
3.Bacia Mearim	0,1	0,1	<b>0,2</b>					
4.Bacia Parnaíba	0,1	0,1	0,2	<b>0,1</b>				
5.Bacia Pericumã	0,1	0,1	0,2	0,2	<b>0,1</b>			
6.Bacia Pindaré	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	<b>0,0</b>		
7.Bacia Tocantins	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	<b>0,0</b>	
8.Bacia Turiaçu	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	<b>0,0</b>



## 5.2 Gene Citocromo Oxidase I (COI)

### 5.2.1 Análise do Fragmento e Diversidade Genética

O sequenciamento do gene Citocromo Oxidase I (COI) do DNA mitocondrial de 117 indivíduos de *Prochilodus* sp. resultou em um fragmento de 574 pb com 546 sítios conservados, 27 sítios variáveis e 12 sítios informativos para a parcimônia. A composição nucleotídica constituiu de 24,4% de adenina, 28,2 de citosina, 18,3% de guanina e 29,1% timina. Dentre todas as sequências analisadas foram encontrados 22 haplótipos e valores de diversidade haplotípica e nucleotídica  $h=0,552$  e  $\pi =0,000181$  respectivamente, quando as populações foram consideradas separadamente os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica variaram como observado na Tabela 10.

**Tabela 10.** Níveis de diversidade genética nas populações de *Prochilodus* sp. com base em sequências do gene COI.

Populações	Índices de Diversidade Molecular				
	N	NH	S	H	Π
Bacia do Amazonas	4	3	2	0,833	0,00203
Bacia Itapecuru	26	5	4	0,289	0,00103
Bacia Mearim	42	7	13	0,268	0,00116
Bacia Parnaíba	18	4	6	0,314	0,00116
Bacia Pericumã	6	4	4	0,867	0,00337
Bacia Pindaré	10	3	2	0,378	0,00070
Bacia Tocantins	4	1	0	0,000	0,00000
Bacia Turiaçu	7	1	0	0,000	0,00000
<b>Populações Agrupadas</b>	<b>117</b>	<b>22</b>	<b>27</b>	<b>0,552</b>	<b>0,000181</b>

N=número amostral, NH= número de haplótipos, S= Sítios polimórficos, h=diversidade haplotípica e  $\pi$ = diversidade nucleotídica.

Do total de haplótipos encontrados, 19 correspondem a haplótipos únicos distribuídos diferentemente entre as bacias em estudo. Destaca-se que um destes haplótipos (H3), possui uma frequência de 77 vezes, agrupando representantes das Bacias estudadas (Itapecuru, Mearim, Pericumã, Pindaré, Turiaçu e Amazonas). Em relação ao táxon *Prochilodus nigricans* (H1-H2 e H22), revelou-se um padrão de distribuição onde os mesmos formam linhagens distintas das maranhenses, havendo compartilhamento de haplótipos (H3) entre as bacias maranhenses e a Bacia Amazônica (Tabelas 11/12).

**Tabela 11.** Distribuição dos 22 haplótipos encontrados para as populações de *Prochilodus* sp. em função das localidades e com base no gene COI.

<b>Haplótipos</b>	<b>Amaz</b>	<b>Ita</b>	<b>Mea</b>	<b>Parna</b>	<b>Peri</b>	<b>Pin</b>	<b>Toc</b>	<b>Tur</b>	<b>Total</b>
H1	1	-	-	-	-	-	-	-	1
H2	1	-	-	-	-	-	-	-	1
H3	2	22	36	-	2	8	-	7	77
H4	-	1	-	-	-	-	-	-	1
H5	-	1	-	-	-	-	-	-	1
H6	-	1	-	-	-	-	-	-	1
H7	-	1	-	-	-	-	-	-	7
H8	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H9	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H10	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H11	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H12	-	-	1	-	-	1	-	-	2
H13	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H14	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H15	-	-	-	15	-	-	-	-	15
H16	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H17	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H18	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H19	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H20	-	-	-	-	2	-	-	-	2
H21	-	-	-	-	-	1	-	-	1
H22	-	-	-	-	-	-	4	-	4
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>42</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>117</b>

Amaz=Amazonas, Ita=Itapecuru, Mea=Mearim, Parna=Parnaíba, Per=Pericumã, Pin=Pindaré, Toc=Tocantins, Tur=Turiaçu.

**Tabela 12.** Sítios Polimórficos nos haplótipos de *Prochilodus* sp. baseados em 574 pb do gene COI.

		Sítios																						
		1 1 1 1 1 2 2 2 3 3 4 4 4 5																						
		1 1 2 3 3 3 4 5 6 6 6 7 8 1 5 6 7 8 1 5 7 6 9 3 4 9 0																						
		2 6 0 1 8 9 3 2 2 4 9 9 5 3 4 6 3 2 0 2 3 3 3 5 2 5 1																						
Haplótipo																								Populações
H1	T A C G T T A G A T A T G G T A G C G A A A C A A T C																							Amaz
H2	. . . . . G . . . . .																							Amaz
H3	. . A . . . . T G . . . . . G . T . . . .																							AMAZ/ITA/MEA/PERI/TUR/PIN
H4	. . . . . T . . . . . G . T . . . .																							ITA
H5	. . . . . G . T . . . .																							ITA
H6	. . A . . . . G . G . . . . G . T . . . .																							ITA
H7	. . . . . G . T . . . .																							ITA
H8	. . . . . G G . T . G . .																							MEA
H9	. . . . A . . . . . G . T . . . .																							MEA
H10	. . A . . . . . A . . . . G . T . . . .																							MEA
H11	C G . . . . . G A A A . G G T C . . . .																							MEA
H12	. G . . . . . G . T . . . .																							MEA/PIN
H13	. . . . . A . . . . G . T . . . .																							MEA
H14	. . A . . . . . A . . . . G . T . G . .																							PARNA
H15	. . . . . G . T . G . .																							PARNA
H16	. . . . . G . . . . . G . T . G . .																							PARNA
H17	. . . . . G . T . G . .																							PARNA
H18	. . . T . . . . C . A . . . . G . T . . . A																							PERI
H19	. . . T . . . . C . . . . G . T . . . A																							PERI
H20	. . . . . G . T . . . A																							PERI
H21	. . . . . A . . . . . G . T . . . .																							PIN
H22	. . . . . G . T . . . C .																							TOC

Amaz=Amazonas, Ita=Itapecuru, Mea=Mearim, Parna=Parnaíba, Per=Pericumã Pin=Pindaré, Toc=Tocantins, Tur=Turiaçu.

### 5.2.2 Estrutura populacional e Análise Molecular de Variância

O teste de AMOVA mostrou que a maior variação ocorreu entre as populações (56,45%) com  $F_{st}$  e valores de  $p$  significativos quando analisados os grupos das bacias maranhenses, já quando analisamos os dois grupos bacias amazônicas e maranhenses observamos que essa maior variação ocorre dentro dos grupos (58,45%) (Tabela 13.)

**Tabela 13.** Resultado da Amova nas populações de *Prochilodus* sp. gene COI.

Tipos de variação	Componentes de variação	% Total de Variação	$F_{st}$ Estatístico	$P^*$
<b>Grupo Maranhão (Itapecuru, Mearim, Parnaíba, Pericumã, Pindaré)</b>				
Dentro das Populações	0.32159	43.55	0.43547	<0,0001
Entre as Populações	0.24807	56.45		
<b>Dois Grupos (Rios Maranhenses e Amazonas)</b>				
Dentro dos grupos	0.32159	58.45	0.41553	<0,0001
Entre populações dentro do grupo	0.24986	45.41		
Entre grupos	-0.02122	-3.86		

\*valores de  $p$ , calculados aleatoriamente com 1023 permutações.

### 5.2. 3 Análises Filogenéticas e Distância Genética

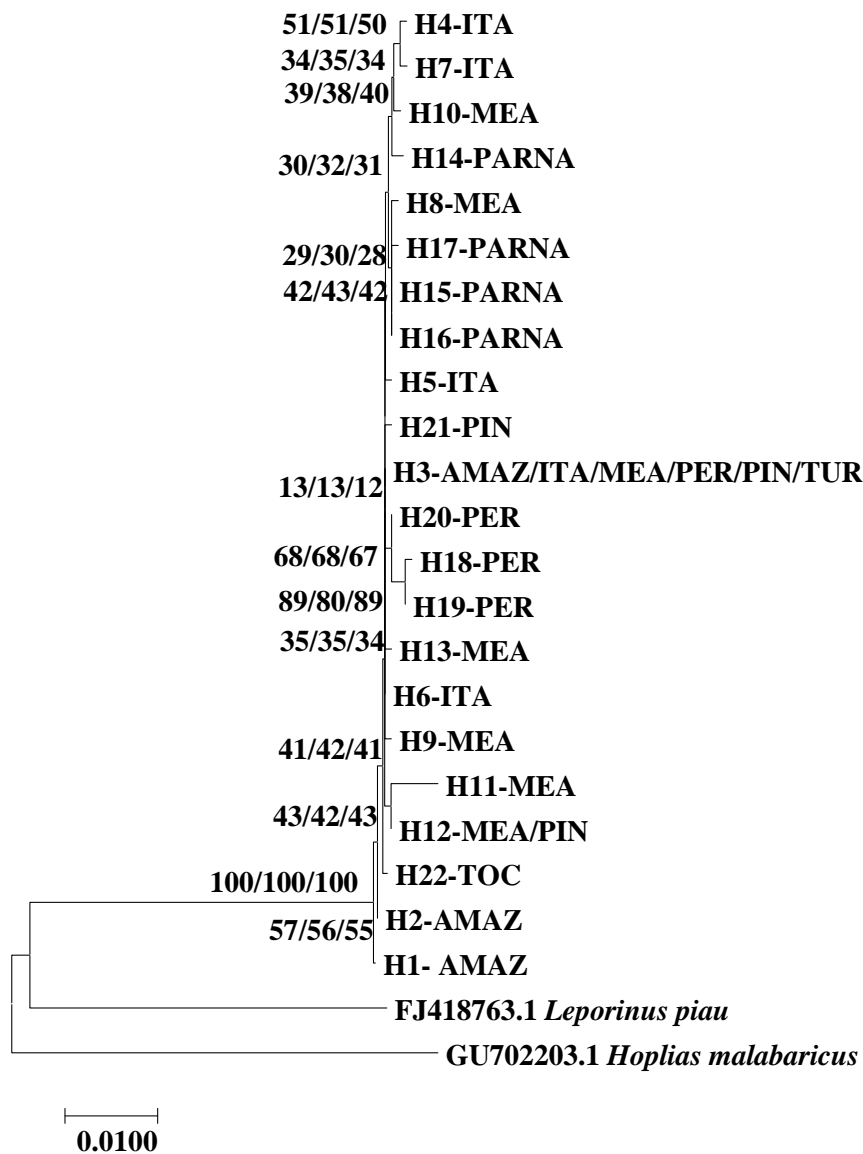
A distância genética entre as populações analisadas variou de 0 a 0, 5% e dentro das populações de 0 a 0, 3% (Tabela 14).

**Tabela 14.** Percentual de divergência Nucleotídica baseado no modelo Kimura 2 parâmetros, entre haplótipos de *prochilodus* sp.com base em sequências do gene COI.

POPULAÇÕES	Divergência Genética							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1.Bacia Amazonas	<b>0,2</b>							
2. Bacia Itapecuru	0,2	<b>0,1</b>						
3.Bacia Mearim	0,2	0,1	<b>0,1</b>					
4.Bacia Parnaíba	0,4	0,3	0,3	<b>0,1</b>				
5.Bacia Pericumã	0,4	0,3	0,3	0,5	<b>0,3</b>			
6.Bacia Pindaré	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	<b>0,1</b>		
7.Bacia Tocantins	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	<b>0,0</b>	
8.Bacia Turiaçu	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,0	0,2	<b>0,0</b>

A reconstrução filogenética baseada em três métodos (MP, MV e NJ) gerou topologias similares agrupando as espécies (100% de *bootstrap*) para os três métodos utilizados, confirmando, portanto a monofilia para o táxon analisado (Figura 5).

**Figura 5.** Árvore haplotípica de Máxima verossimilhança (MV) com base no algoritmo de Tamura (1992) no gene COI do mtDNA, os números ao lado dos ramos da esquerda para a direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima verossimilhança, Agrupamento de Vizinhos, Máxima Parcimônia.



#### 5.2.4 Identificação dos espécimes no BOLDSystems (The Barcode of Life Data System)

Para verificar a identificação correta da espécie foi realizada a comparação das sequências nucleotídica obtidas no presente trabalho com as sequências depositadas no banco de dados do BOLD (The Barcode of Life Data System). A percentagem de

identificação dos espécimes no BOLDSystem foi de 98,6% - 100% de similaridade com a espécie *Prochilodus lacustris* e 98,04% - 100% para *Prochilodus nigricans* (Tabela 15)

**Tabela 15.** Identificação molecular dos haplótipos mais frequentes de *Prochilodus* sp. realizada através de comparações de sequências obtidas das bacias maranhenses com sequências disponíveis na plataforma BOLDSystems.

NH	Freq.	Localidade	Ident.morfologica	Ident.boldsystems	Similaridade <i>P.lacustris</i>	Similaridade <i>P.nigricans</i>
H1	1	AMA	<i>P. nigricans</i>	<i>P.nigricans</i>	99,18%	100%
H2	1	AMAZ	<i>P.nigricans</i>	<i>P. nigricans</i>	99,18%	100%
H3	77	AMAZ/ITA/ME/ PERI/PIN/TUR	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	100%	99,06%
H4	1	ITA	<i>P.lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,48%	99,06%
H5	1	ITA	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,88%	99,06%
H6	1	ITA	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	100%	99,06%
H7	1	ITA	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,48%	98,04%
H8	1	MEA	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,65%	99,03%
H9	1	MEA	<i>P.lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,83%	99,48%
H10	1	MEA	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,65%	99,03%
H11	1	MEA	<i>P.lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	98,6%	98,25%
H12	2	MEA/PIN	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,83%	99,48%
H13	1	MEA	<i>P. lacustris</i>	<i>P.lacustris</i>	99,83%	99,48%
H14	1	PARNA	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,48%	99,13%
H15	15	PARNA	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,83%	99,48%
H16	1	PARNA	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,3%	98,65%
H17	1	PARNA	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,65%	99,03%
H18	1	PERI	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,48%	99,13%
H19	1	PERI	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,83%	99,48%
H20	2	PERI	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,83%	99,48%
H21	1	PIN	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	99,83%	99,48%
H22	4	TOC	<i>P.nigricans</i>	<i>P. nigricans</i>	99,83%	99,82%

### 5.3 GENE *CYT b*

#### 5.3.1 Análise do Fragmento e Diversidade Genética

O sequenciamento do gene Citocromo *b* (*Cyt b*) do DNA mitocondrial de 85 indivíduos da espécie de *Prochilodus* sp. resultou em um fragmento de 839 pb com 812 sítios conservados, 27 polimórficos e 27 sítios informativos para parcimônia. A composição nucleotídica constituiu de 27,4% de adenina, 32,1% de citosina, 14,7% de guanina e 25,9% de timina. Dentre todas as sequências foram encontradas 12 haplótipos e valores de diversidade haplotípica e nucleotídica  $h = 0,909$  e  $\pi = 0,01143$  respectivamente. Quando as populações foram consideradas separadamente os valores de diversidade haplotípica variou como observado na Tabela 16.

**Tabela 16.** Níveis de diversidade genética nas populações de *Prochilodus* sp. com base em sequências de gene *Cytb*.

Populações	N	NH	S	Índices de Diversidade Molecular	
				H	$\Pi$
Bacia do Amazonas	14	2	1	0,527	0,00063
Bacia Itapecuru	15	2	2	0,248	0,00059
Bacia Mearim	17	3	8	0,662	0,00400
Bacia Parnaíba	13	1	0	0,000	0,00000
Bacia Pericumã	3	1	0	0,000	0,00000
Bacia Pindaré	6	2	1	0,333	0,00040
Bacia Tocantins	8	1	0	0,000	0,00000
Bacia Turiaçu	9	1	0	0,000	0,00000
<b>Populações Agrupadas</b>	<b>85</b>	<b>12</b>	<b>27</b>	<b>0,909</b>	<b>0,1143</b>

N=número amostral, NH= número de haplótipos, S= Sítios polimórficos, h=diversidade haplotípica;  $\pi$ = diversidade nucleotídica.

Do total de haplótipos encontrados dois haplótipos (H1/H2) foram exclusivos para a bacia Amazônica (*Prochilodus nigricans*), dos H3 ao H10 foram exclusivos para as bacias maranhenses, com apenas o H9 sendo compartilhado entre os rios Pericumã e Pindaré. O H12 foi exclusivo para a bacia maranhense já o H11 foi exclusivo para a bacia do Tocantins (Tabela 17 e 18).

**Tabela 17.** Distribuição dos 12 haplótipos encontrados para as populações de *Prochilodus* sp. em função das localidades e com base no gene *Cytb*.

<b>Haplótipos</b>	<b>Amaz</b>	<b>Ita</b>	<b>Mea</b>	<b>Parna</b>	<b>Per</b>	<b>Pin</b>	<b>Toc</b>	<b>Tur</b>	<b>Total</b>
H1	8	-	-	-	-	-	-	-	8
H2	6	-	-	-	-	-	-	-	6
H3	-	13	-	-	-	-	-	-	13
H4	-	2	-	-	-	-	-	-	2
H5	-	-	8	-	-	-	-	-	8
H6	-	-	3	-	-	-	-	-	3
H7	-	-	6	-	-	-	-	-	6
H8	-	-	-	13	-	-	-	-	13
H9	-	-	-	-	3	1	-	-	4
H10	-	-	-	-	-	5	-	-	5
H11	-	-	-	-	-	-	8	-	8
H12	-	-	-	-	-	-	-	9	9
<b>TOTAL</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>85</b>

Amaz=Amazonas, Ita=Itapecuru, Mea=Mearim, Parna=Parnaíba, Per=Pericumã, Pin=Pindaré, Toc=Tocantins, Tur=Turiaçu.



**Tabela 18.** Sítios Polimórficos nos haplótipos de *Prochilodus* sp. baseados em 839pb do gene *Cyt b*.

Haplótipos	SÍTIOS																				População								
	8	9	1	2	3	4	5	6	7	7	8	2	7	8	9	0	2	6	3	9		9	9	9	8	5	4	5	
H1	A	G	T	A	T	G	G	C	T	A	A	A	C	A	G	A	C	G	T	C	G	T	A	C	G	T	G	AMAZ	
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	AMAZ	
H3	.	.	.	T	C	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	ITA	
H4	.	.	.	T	C	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	T	.	C	.	ITA
H5	T	C	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	.	MEA	
H6	T	C	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	T	G	A	C	.	T	.	C	G	T	A	C	.	MEA
H7	T	C	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	T	G	A	C	.	.	.	G	.	.	C	.	MEA	
H8	T	C	C	T	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	A	G	A	C	.	.	A	.	G	T	.	C	.	PARNA
H9	T	C	C	T	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	A	G	A	C	.	.	.	G	.	.	C	A	.	PER/PIN
H10	T	C	C	T	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	A	G	A	C	.	.	.	G	.	.	.	A	.	PIN
H11	T	C	C	T	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	T	A	G	A	C	C	.	.	.	.	.	A	.	TOC
H12	T	C	C	T	A	T	T	A	A	C	C	C	A	T	C	C	A	C	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	TUR

Amaz=Amazonas, Ita=Itapecuru, Mea=Mearim, Parna=Parnaíba, Per=Pericumã Pin=Pindaré, Toc=Tocantins ,Tur=Turiaçu.

### 5.3.2 Estrutura Populacional e Análise Molecular de Variância

O teste de AMOVA mostrou que a maior variação ocorreu entre as populações com  $F_{st}$  e valores de  $p$  significativos (Tabela 19).

**Tabela 19.** Resultado da Amova nas Populações de *Prochilodus* sp. no gene *Cytb*

Tipos de variação	Componentes de variação	% Total de Variação	$F_{st}$ Estatístico	$P^*$
<b>Grupo Maranhão ( Itapecuru, Mearim, Parnaíba, Pericumã, Pindaré)</b>				
Dentre as Populações	0.48798	9.36	0.90641	<0,001
Entre as Populações	4.72625	90.64		
<b>Dois Grupos ( Rios Maranhenses e Amazonas)</b>				
Dentre os grupos	0.44873	7.45		<0,001
Entre populações dentro do grupo	4.78864	79.51	0.92549	
Entre grupos	0.78530	13.04		

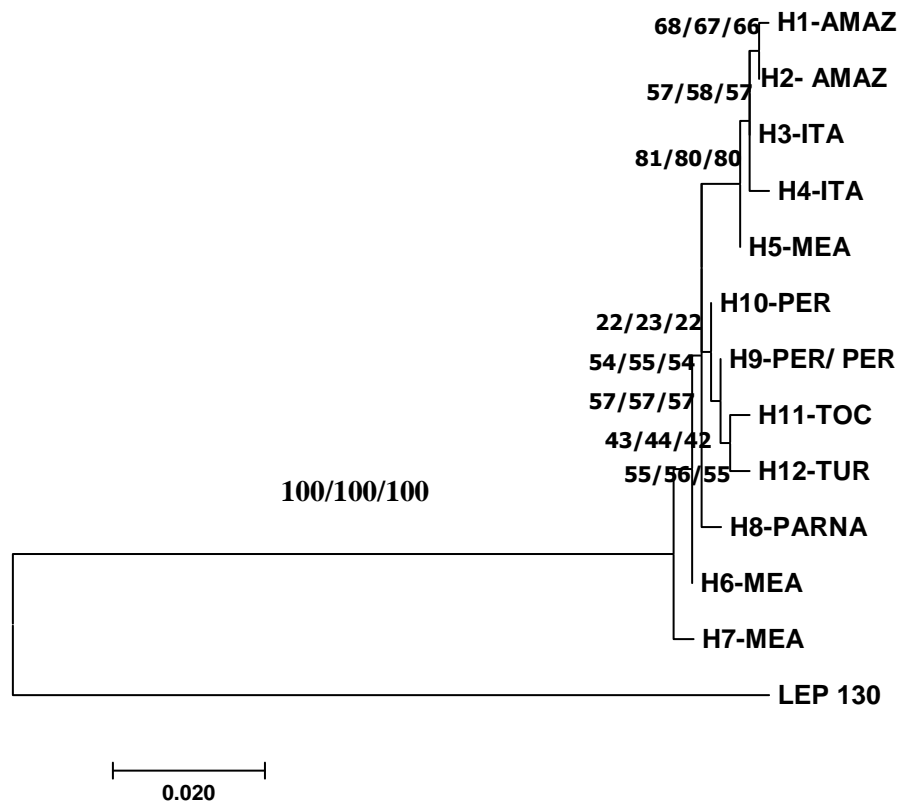
\*valores de  $p$ , calculados aleatoriamente com 1023 permutações.

### 5.3.3 Análises Filogenéticas e Distância Genética

A reconstrução filogenética de haplótipos baseada em três métodos (MP, MV e NJ) gerou topologias similares, agrupando fortemente os exemplares de *Prochilodus* sp. com 100% de *bootstrap* para a Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança Neighbor-Joining, confirmando, portanto, a monofilia para o táxon analisado (Figura 6).

A distância genética entre as populações analisadas variou de 0,1 % a 2,4 %, quando relacionados com os provenientes do rio da Amazônia apresentou a intraespecífica variando de 0,4% a 0% (Tabela 20).

**Figura 6:** Árvore haplotípica de Máxima verossimilhança (MV), com base no algoritmo de Tamura (1992) no gene *Cytb* do mtDNA. Os números ao lado do ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima verossimilhança, Agrupamento de Vizinhos, Máxima Parcimônia.



**Tabela 20.** Percentual de divergência nucleotídica baseado no modelo Kimura 2 parâmetros, entre haplótipos de *prochilodus* sp. com base em sequências do gene *Cyt b*.

POPULAÇÕES	Divergência Genética							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Bacia Amazonas</b>	<b>0,1</b>							
<b>2. Bacia Itapecuru</b>	0,7	<b>0,1</b>						
<b>3. Bacia Mearim</b>	1,1	1,2	<b>0,4</b>					
<b>4. Bacia Parnaíba</b>	1,8	1,4	0,8	<b>0,0</b>				
<b>5. Bacia Pericumã</b>	1,6	1,4	0,7	0,4	<b>0,0</b>			
<b>6. Bacia Pindaré</b>	1,5	1,5	0,8	0,5	0,1	<b>0,0</b>		
<b>7. Bacia Tocantins</b>	1,7	1,8	1,2	0,8	0,5	0,4	<b>0,0</b>	
<b>8. Bacia Turiaçu</b>	2,4	2,3	1,9	1,7	1,3	1,2	1,3	<b>0,0</b>

## 5.4 GENE TROP

### 5.4.1 Análise do Fragmento e Diversidade Genética

O sequenciamento do gene  $\alpha$ -tropina (TROP) do DNA nuclear de 101 indivíduos da espécie de *Prochilodus* sp. resultou em um fragmento de 290 pb com 266 sítios conservados, 24 polimórficos e 11 sítios informativos para parcimônia. A composição nucleotídica constituiu de 28,3 % de adenina, 15,9 % de citosina, 31,3 % de guanina e 24,5 % de timina. Dentre todas as sequências foram encontradas 17 haplótipos e valores de diversidade haplotípica e nucleotídica  $h = 0,389$  e  $\pi = 0,00325$  respectivamente, quando as populações foram consideradas separadamente os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica variaram como observado na Tabela 21.

**Tabela 21.** Níveis de diversidade genética nas populações de *Prochilodus* sp. com base em sequências de gene TROP.

Populações	Índices de Diversidade Molecular				
	N	NH	S	H	$\Pi$
Bacia do Amazonas	15	3	3	0,457	0,00315
Bacia Itapecuru	18	2	2	0,209	0,00144
Bacia Mearim	19	7	8	0,608	0,00417
Bacia Parnaíba	15	2	1	0,133	0,00046
Bacia Pericumã	5	3	6	0,700	0,04768
Bacia Pindaré	10	2	1	0,200	0,00080
Bacia Tocantins	11	4	6	0,600	0,00476
Bacia Turiaçu	8	2	2	0,250	0,00172
<b>Populações Agrupadas</b>	<b>101</b>	<b>17</b>	<b>24</b>	<b>0,389</b>	<b>0,00325</b>

N=número amostral, NH= número de haplótipos, S= Sítios polimórficos, h=diversidade haplotípica;  $\pi$ = diversidade nucleotídica.

Do total de haplótipos encontrados o haplótipos H1 foi o mais frequentes, agrupando todas as populações presentes nas bacias maranhenses estudadas. Dentre os haplótipos encontrados 10 corresponderam a haplótipos únicos (*singletons*) distribuídos diferentemente nas bacias Mearim, Parnaíba, Pericumã e Tocantins (Tabela 22).

**Tabela 22.** Distribuição dos 17 haplótipos encontrados para as populações de *Prochilodus* sp. em função das localidades e com base no gene TROP.

<b>Haplótipos</b>	<b>Amaz</b>	<b>Ita</b>	<b>Mea</b>	<b>Parna</b>	<b>Per</b>	<b>Pin</b>	<b>Toc</b>	<b>Tur</b>	<b>Total</b>
H1	11	16	12	14	3	9	7	7	79
H2	2	-	-	-	-	-	-	-	2
H3	2	-	-	-	-	-	-	-	2
H4	-	2	-	-	-	-	-	-	2
H5	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H6	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H7	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H8	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H9	-	-	2	-	-	-	-	-	2
H10	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H11	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H12	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H13	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H14	-	-	-	-	-	1	-	-	1
H15	-	-	-	-	-	-	1	-	1
H16	-	-	-	-	-	-	2	-	2
H17	-	-	-	-	-	-	1	1	2
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>101</b>

Amaz=Amazonas, Ita=Itapecuru, Mea=Mearim, Parna=Parnaíba, Per=Pericumã, Pin=Pindaré, Toc=Tocantins, Tur=Turiaçu.

### 5.4.2 Estrutura Populacional e Análise Molecular de Variância

O teste de AMOVA mostraram que a maior variação ocorreu dentro das populações e grupos com *Fst* e valores de *p* significativos (Tabela 23).

**Tabela 23.** Resultado da Amova nas Populações de *Prochilodus* sp. no gene TROP.

Tipos de variação	Componentes de variação	% Total de Variação	<i>Fst</i> Estatístico	<i>P</i> *
<b>Grupo Maranhão ( Itapecuru, Mearim, Parnaíba, Pericumã, Pindaré)</b>				
Dentre as Populações	0.37143	94.25	0.05747	<0,001
Entre as Populações	0.02265	5.75		
<b>Dois Grupos ( Rios Maranhenses e Amazonas)</b>				
Dentre os grupos	0.38433	90.01	0.09990	<0,001
Entre populações dentro do grupo	0.02157	5.05		
Entre grupos	0.02109	4.94		

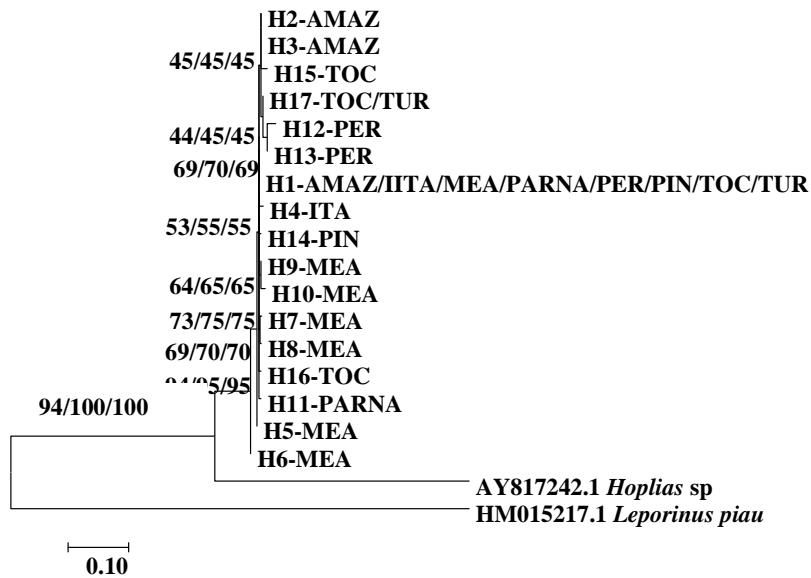
\*valores de *p*, calculados aleatoriamente com 1023 permutações.

### 5.4.3 Análises Filogenéticas e Distância Genética

A reconstrução filogenética baseada em três métodos (MP, MV e NJ) gerou topologias similares, agrupando fortemente os exemplares de *Prochilodus* sp. com 94% a 100% de *bootstrap*, confirmando, portanto, a monofilia para o táxon analisado (Figura 7).

A distância genética entre as populações analisadas variou de 0,1% a 0,7%, quando relacionados com os provenientes da Bacia Amazônia apresentou a intraespecífica variando de 0,1 % a 0,9 % (Tabela 24).

**Figura 7.** Árvore haplotípica obtida pelo Modelo de Máxima verossimilhança (MV), com base no algoritmo de Tamura (1992) no gene TROP. Os números ao lado do ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima verossimilhança, Agrupamento de vizinhos, Máxima parcimônia.



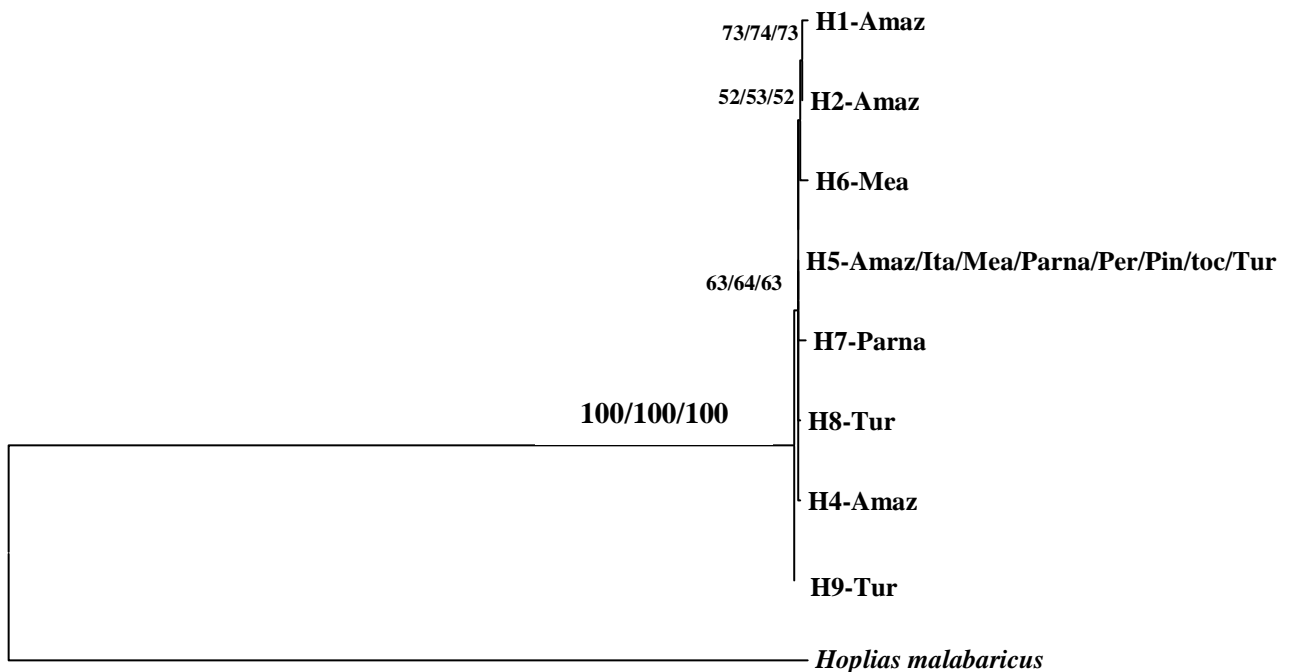
**Tabela 24.** Percentual de divergência Nucleotídica baseado no modelo Kimura 2 parâmetros, entre haplótipos de *prochilodus* sp. com base em sequências do gene TROP.

POPULAÇÕES	Divergência Genética							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Bacia Amazonas</b>	<b>0,4</b>							
<b>2. Bacia Itapecuru</b>	0,3	<b>0,2</b>						
<b>3. Bacia Mearim</b>	0,5	0,3	<b>0,5</b>					
<b>4. Bacia Parnaíba</b>	0,2	0,1	0,3	<b>0,1</b>				
<b>5. Bacia Pericumã</b>	0,7	0,6	0,7	0,5	<b>0,9</b>			
<b>6. Bacia Pindaré</b>	0,3	0,1	0,3	0,1	0,5	<b>0,1</b>		
<b>7. Bacia Tocantins</b>	0,5	0,4	0,5	0,3	0,7	0,3	<b>0,6</b>	
<b>8. Bacia Turiaçu</b>	0,3	0,2	0,4	0,1	0,5	0,1	0,4	<b>0,2</b>

### 5.5 Análises dos dados concatenados rRNA 16S /COI e Cyt b

A partir dos dados concatenados de 60 indivíduos de *Prochilodus* sp. resultado de fragmentos dos genes mitocondriais o rRNA16S com 567 pb, o gene COI com 574 pb e o Cyt b com 839, resultou um fragmento de 1970pb total utilizando depois de alinhado apenas 1360pb, com 810 sítios conservados, 550 sítios variáveis e 11 sítios informativos para a parcimônia. A composição nucleotídica foi constituída de 28,3% de adenina, 28,3% de citosina ,18,6% de guanina e 24,5% de timina. Dentre todas as sequencias foram encontrados valores de diversidade haplotípica e nucleotídica  $h=0,418$  e  $\pi= 0,01606$  respectivamente. A árvore obtida apresentou topologia similar as topologias individualizadas de cada gene (rRNA16S/COI/Cytb), confirmando um grupo monofilético, indicando a presença de pouca diferenciação entre os táxons (Figura 8).

**Figura 8:** Árvore haplotípica obtida com dados concatenada dos genes rRNA 16S, COI, Cytb Máxima verossimilhança (MV) com base no algoritmo de Tamura (1992). Os números ao lado do ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima verossimilhança, Agrupamentos de vizinhos, Máxima Parcimônia.



0.050



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Identificação Molecular

Vários estudos utilizando marcadores cromossômicos e moleculares têm fornecido informações para a separação de espécies próximas e muitas vezes podem esclarecer a história evolutiva das populações. As ferramentas moleculares são importantes para elucidar algumas problemáticas, mostrando assim a baixa diversidade genética os exemplares de *Prochilodus* sp. (CASTRO; VARI, 2004, TAYLOR et al., 2006, HONNA, 2010, ORTÍ et al., 2008; IERVOLINO et al., 2010; PIORSKI et al., 2010; CHENG et al., 2012; BORBA et al., 2013; TERCENIO et al., 2013; PEREIA et al., 2013; MELO et al., 2016).

O gênero *Prochilodus* tem sua sistemática complexa, devido à dificuldade de diferenciar os seus caracteres morfológicos adotados como padrão na sua identificação e diferenciação das espécies. Entre eles observa-se que variações morfológicas são limitadas, dificultando muita das vezes sua identificação (CASTRO, 1993; SIVASUNDAR et al., 2001).

A identificação molecular da espécie analisada, a partir da comparação de nossas sequências do gene COI com aquelas depositada na plataforma BOLDSYSTEMS, demonstrou incertezas taxonômicas para o grupo. As sequências utilizadas mostraram altos índices de similaridade genética com *Prochilodus lacustris* e *Prochilodus nigricans* em 98,4 % e 100% respectivamente. Portanto, dentro do limiar de até 3% proposto por Herbert et al. (2003) exigido para a identificação molecular quando se trata de uma mesma espécie.

A eficácia do código de barras de DNA para a avaliação da biodiversidade e para resolução de problemas taxonômicos, tal como a identificação de espécies, tem gerado grandes discussões, embora essa abordagem tenha provado ser bem-sucedida para delimitar espécies num grande número de táxons (HEBERT et al., 2004; CLARE et al., 2006; WARD et al., 2009; MELO et al., 2016). Os resultados do presente trabalho indicam que os níveis de divergência genética nos espécimes de *Prochilodus* sp. podem ser restritos a populações de bacias hidrográficas diferentes, mas podendo ocorrer o mesmo entre os indivíduos em simpatria, conforme foi demonstrado no nosso estudo, com as populações dos rios Itapecuru, Mearim, Pindaré e Turiaçu, o que reforça a possibilidade de um complexo de espécies sem modificações abruptas na morfologia.

## 6.2 Diversidade Genética

Os resultados analisados de *Prochilodus* sp. com base nos fragmentos gênicos analisados mostrou alta diversidade haplotípica (h) e baixa diversidade nucleotídica para todos as sequências analisadas. Estes resultados são similares aqueles encontrados por Silva et al. (2008) e Silva et al. (2011) utilizando o marcador rRNA16S para a bacia do rio Itapecuru apontando problemas taxonômicos entre as espécies *Prochilodus nigricans* Spix; Agassiz (1829) distribuída na bacia Amazônica e na região Nordeste (CASTRO, 1993), e *Prochilodus lacustris* Steindachner (1907) de ocorrência na bacia do rio Itapecuru/MA. Essas duas espécies identificadas morfologicamente como distintas, apresentaram baixos índices de divergência genética como pode ser observado em nossos resultados.

Em nossos estudos para os genes mitocondriais, observamos uma composição nucleotídica com maior percentual da base nucleotídica adenina com 30,8% para o gene rRNA 16S, igualmente observado por Silva et al. (2008) analisando espécies de *Prochilodus* do rio Itapecuru. Esse padrão também foi observado por Silva (2008) em estudos com peixes da família Anostomidae (32,1 %), Santos (2009) com espécies da família Curimatidae (30, 9%) e Luz (2011) em exemplares da família characidae (30,8%) todos pertencentes à ordem characiformes e oriundos da bacia do Itapecuru, segundo Soares (2008) tal tendência é comum dentro do grupo. Para os genes COI e Cyt *b* a composição nucleotídica mostrou um maior percentual de citosina (32,1%) e Timina com (29,1%) o mesmo encontrado por Melo et al., (2018) em *Prochilodus*, Reis (2011) para o gênero *Pimelodus* e Marques (2011) em seu estudo sobre a diversidade cromossômica e molecular de *Hoplias malabaricus* da região do baixo Amazonas, porém divergiu de Alves-Gomes et al. (1995) que relata tendência para um maior percentual de adenina nos peixes.

Piorski (2010) estudando a diversidade genética e a filogeografia de *Prochilodus lacustris* por meio da região controle do mtDNA, indica que esta espécie ocorre nos rios maranhenses, e que sua distribuição possa ser estendida para o Tocantins, contudo a alta divergência apresentada em relação a *Prochilodus nigricans* (3,5% a 4,4%) deve se a alta variabilidade dessa região. Este fato pode ser explicado devido essas bacias possuírem certa conectividade e o fluxo gênico ser maior, uma vez que os rios Mearim e Pindaré formam um sistema hidrológico que desemboca no rio Itapecuru na região do Golfão Maranhense.

Melo et al. (2018) detectou em seu estudo pouca divergência genética entre as linhagens de *Prochilodus* de uma vasta área da América do Sul. Nesse estudo os autores evidenciaram que espécies de *Prochilodus* com distribuição distinta são pouco variáveis compreendendo apenas uma única linhagem mitocondrial, sugerindo a hipótese de que a migração tem forte efeito na diversificação de espécies. Estes autores relatam que a migração e fluxo gênico influenciaram diretamente no estado morfológico conservado neste gênero, isto levanta algumas questões sobre os padrões de migração que influenciaram a diversificação sem mudanças morfológicas.

López-Fernandes; Albert (2011) sugerem que migrações sucessivas de Prochilodontídeos no Oligoceno e eventos de variância permitiram o sucesso da colonização deste grupo nas principais bacias hidrográficas neotropicais. Entretanto, questiona-se ser apenas a migração responsável pela baixa variação genética de *Prochilodus* e outras duas explicações surgem em torno dessa problemática, uma delas atribui a hibridização entre espécies nativas e introduzidas de *Prochilodus* recentemente relatada para o rio Jequitinhonha (SALLES et al., 2017) e a outra menciona episódios recentes de diversificação de espécies que não possibilitou o acúmulo de variação nos haplótipos. Em nossos resultados pouca divergência genética foi observada em *Prochilodus* de bacias hidrográficas distintas confirmando o padrão descrito por Melo et al., (2018).

A baixa variabilidade em nosso estudo por meio dos marcadores mitocondriais (COI, rRNA16S e Cyt *b*) aparenta ser comum do gênero, já que baixos índices de diferenciação foram retratados por outros autores utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares, como nos estudos de Sousa (2014), Frable (2016) e Melo et al., (2018) que utilizaram diferentes marcadores para o seu estudo.

### **6.3 Estruturação populacional**

Segundo Torres et al. (2011), a variação genética populacional deve ser em função tanto da diversidade genética disponível originalmente da espécie, quanto de processos como seleção, fluxo gênico, sistema de cruzamento entre outro, que governam com a variação que é repassada entre e dentro das populações. No caso dos peixes água doce suas populações em geral se distribuem por locais isolados, o que pode minimizar as trocas genica entre elas, levando assim ao processo de diferenciação genica (RAMO, 2007). Como as bacias do Pindaré e Mearim tem na sua maioria algum

tipo de conexão uma com as outras ,os valores de divergência observados em nosso estudo podem ser em função dessas conexões geográficas.

A AMOVA revelou que há uma estruturação de linhagens diferenciadas, a qual é apoiada significativamente pelo índice de fixação (*Fst*). De acordo com Wrigth (1965) valores entre 0 e 0,05 indicam baixo nível de diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,25 indicam diferenciação genética moderada e acima de 0,25 indicam elevada diferenciação. Nossos resultados permitiram verificar que as bacias analisadas apresentam valores *Fst* baixo (0,06) a elevado (0,92), portanto mais um indicativo de que as populações das bacias analisadas apresentam uma estruturação genética.

Segundo Hilsdorf et al. (2006), a avaliação genética de uma população distribuída em diferentes rios indica a intensidade com que o fluxo gênico ocorre entre as populações. Para Sirol e Britto (2006), a diminuição da variabilidade genética reduz a capacidade que os peixes possuem de se adaptarem a diferentes condições ambientais, sendo por isso um fator de preocupação, uma vez que leva a perda da biodiversidade. A união dos fatores que influenciam a diversidade e diferenciação genética entre as populações, juntamente com a estimativa da diversidade genética, e a distribuição intra e interpopulacional, é fundamental para traçar medidas de conservação de espécies, especialmente em táxons em que a taxonomia seja confusa, como em *Prochilodus* sp.

Vale ressaltar, que os peixes desta família exibem certa homogeneidade e conservação dos caracteres morfológicos adotados para a distinção das diferentes espécies. Isto pode ser explicado devido a esta espécie está altamente distribuída ao longo das bacias hidrográficas da América do Sul, talvez por ter uma grande capacidade migratória com propósito reprodutivo (FRABLE et al., 2016).

Em nossos resultados utilizando os marcadores moleculares (rRNA16S, COI, Cyt *b* e TROP) observou-se que *Prochilodus lacustris* das bacias maranhenses e *Prochilodus nigricans* bacia amazônica não apresentaram índices de divergência genética suficiente para discriminar cada espécie, revelando que estamos diante de um único táxon, e que deve ser feita uma revisão para este táxon.

## 7 CONCLUSÃO

- Os genes utilizados no trabalho constituem bons marcadores moleculares na caracterização dos estoques de *Prochilodus lacustris*, onde foi possível observar os baixos valores de distância genética;
- A identificação molecular obtida com o gene COI confirmou uma única taxonômica para os rios maranhenses e rios da Amazônia com alto nível de similaridade;
- As populações estudadas apresentaram baixos níveis de variabilidade genética, com os diferentes marcadores mitocondriais (rRNA16S, COI, Cyt *b*) e nuclear (alfa- tropimiosina);
- A Amova confirmou a estruturação genética nas populações estudadas com *Fst* de baixo a moderados (rRNA16S-0,06; COI-0,41 e TROP- 0,09) exceto para o Cyt *b* que apresentou *Fst* com valor de 0,92 com *p* altamente significativo.
- *Prochilodus lacustris* (Maranhão) e *Prochilodus nigricans* (Amazônia), de acordo com esse resultado apresentam-se como um único táxon.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-GOMES, J.; ORTÍ, G.; HAYGOOD, M.; HEILIGENBERG, W.; MEYER, A. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. **Mol. Biol. Evol.**, 12: 298-318. 1995.
- ANNE, C. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: From molecular evolution to practical aspects. **Genetica**, 127(1-3)p.101-120. 2006.
- ARAÚJO, S. A.; GURGEL, H. C. B.; NASCIMENTO, R. S. S. Indicadores do desenvolvimento gonadal e nutricional de *Prochilodus cearensis* (Steindachner, 1911) (Characiformes, Prochilodontidae) no açude Itans/Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringa, v.25, no.2, p.377-384, 2003.
- ARROYAVE, J.; STIASSNY, M. L. J. Phylogenetic relationships and the temporal context for the diversification of African characins of the family Alestidae (Ostariophysi:Characiformes): evidence from DNA sequence data. **Mol. Phylogenet. Evol**, v. 60, p. 285–397, 2011.
- AVELINO, G. S. *et al.* Molecular identification of *Leporinus* from the south portion of South America. **DNA Barcodes**, 2015.
- BAYLEY, P. B.; PETRERE JÚNIOR, M. Amazon fisheries: Assessment methods, current status, and management options. *In: Proceedings of the International Large River Symposium (LARS). Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2015
- BELCHIOR, M.; TAI, D. W.; HELD, F. C. VON. **Indicadores IBGE**. 2017
- BORBA, R. S. DE *et al.* Genetic structure of the ornamental tetra fish species *Piabucus melanostomus* Holmberg, 1891 (CHARACIDAE, IGUANODECTINAE) in the Brazilian Pantanal wetlands inferred by mitochondrial DNA sequences. **Biota Neotropica**, 2013.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de Identificação**. Embrapa. Brasília-DF. 1999.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de Identificação**. Embrapa, Corumbá- SP. 184p. 1999.
- CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.36, p 135-153. 2005.

- CASTRO, R.M.C.; VARI R.P. Family Prochilodontidae. In: Checklist of the Freshwaters of South and Central America. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ ed. **EDIPUCRS1**, Porto Alegre, Brasil. 2003.
- CASTRO, R. M. C.; VARI, R. . Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 622, p. 1–189, 2004.
- CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, v.622,p.1-189.2004.
- CODEVASF. **Companhia de Desenvolvimento do vale do São Francisco**. 2010.
- DALIA, R. L. “**Variabilidade genética e filogeografia de populações de Prochilodus lineatus (Pisces: prochilodontidae) das bacias dos rios Paraguai-Paraná e da bacia Amazônica: bases para programas de conservação e de piscicultura.**” f.64.2011.
- DILLMAN, C. B.; SIDLAUSKAS, B. L.; VARI, R. P. A morphological supermatrix based phylogeny for the Neotropical fish superfamily Anostomoidea (Ostariophysi: Characiformes): phylogeny, missing data and homoplasy. **Cladistics**, p. 1–21, 2015. doi: 10.1111/cla.12127.
- ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Species by Family/Subfamily**. Disponível em : <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/speciesByFamily.asp>. Acesso em: 27 de Dezembro de 2018.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G., S. **a software for population data analysis**. Version 3.1. Geneva. University of Geneva. 2010.
- FARIAS, I. P. *et al.* A. Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of Neotropical Assemblage. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, p. 703–711, 2001.
- FRABLE, B. W. *et al.* Data on the multilocus molecular phylogenies of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). **Data in Brief**, 2016.
- FRAGA, E. *et al.* Variabilidade genética em populações naturais de Leporinus piau (Anostomidae, Characiformes) da bacia do Rio Itapecuru. **Revista Trópica**, v. 8, p. 28–40, 2014.
- FRIESEN, V. L. *et al.* Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five nuclear introns in vertebrates. **Molecular Ecology**, 1999.
- GARCIA, A. *et al.* Patterns of commercial fish landings in the Loreto region (Peruvian

- Amazon) between 1984 and 2006. **Fish Physiology and Biochemistry**, 2009.
- GODINHO, A. L. Life history movements and spawning of São Francisco River fishes, Brazil. **Department of Natural Resources Conservation**, Wildlife and fisheries conservation. 2005.
- HILSDORF, A. W. W.; RESENDE, E. K.; MARQUES, D. K. S. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de águas continentais no Brasil: Situação atual e perspectivas. **Documentos/ Embrapa Pantanal**, Corumbá. 43f. 2006.
- HONNA, CRISTIANE YURI. Diversidade gênica no gênero *Astyanax* (Teleostei: Characidae) através de análise de PCR-RFLP de DNA mitocondrial. 2010.
- HUBERT, N.; RENNO, J. F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, 2006.
- IBGE. **IBGE Censo 2010**.
- IBGE. Zoneamento Geoambiental do Estado do Maranhão-diretrizes gerais para a ocupação territorial. Salvador, 1997.
- IERVOLINO, F.; RESENDE, E. K. DE; HILSDORF, A. W. S. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. **Fisheries Research**, 2010.
- IVANOVA, N. V. *et al.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes**, 7:544-548. 2007.
- LIBRADO, P. . R. J. **DnaSPv5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25:**,1451-1452. 2009.
- LOPERA-BARRERO, N. M. *et al.* Genetic diversity of *Prochilodus lineatus* stocks using in the stocking program of Tietê River, Brazil. **Revista MVZ Córdoba**, 18 v.3. 2013.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H., and ALBERT, J. S. “Paleogene radiations,” in *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*, eds J. S. Albert and R. E. Reis (Berkeley, CA; Los Angeles, CA: University of California Press), 105–117. 2011.
- LOVEJOY, N. R.; ARAÚJO, M. L. G. DE. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, 2000.
- LUZ, L. A. **Diferenciação genética em populações de *Pygocentrus nattereri* (Characidae) com base em sequências do DNA mitocondrial**. Monografia (graduação) – Universidade Estadual do Maranhão, CESC/UEMA, Caxias. 2011.



- MELO, B. F. Genética de populações de *Prochilodus argenteus* e *P. costatus* do médio São Francisco. Botucatu, **Dissertação (Mestrado)-Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista**, 2011.
- MELO, B. F. *et al.* Molecular phylogeny of the Neotropical fish genus *Tetragonopterus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Mol. Phylogenet. Evol**, v. 94, p. 709–717, 2016. doi: 10.1016/j.ympev.2015.10.022.
- MELO, B. F. *et al.* Little Divergence among mitochondrial lineages of *Prochilodus* (Teleostei, characiformes). **frontiers in genetics**. V 9, p 1-9, 2018.
- MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. **Biochemistry and molecular biology of fishes**, 1993.
- MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE; SECRETARIA DE RECURSOS HÍDRICOS. **Caderno da região hidrográfica Tocantins - Araguaia**. 2006.
- MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v.12, n.7, p.1855-1867. 2003.
- OLIVEIRA, C. *et al.* Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 275, 2011.
- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: From chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.81-100. 2009.
- ORTÍ, G. *et al.* Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.343-351. doi: [http:// dx.doi.org/10.1590/s1415-47572008000200030](http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572008000200030). 2008
- ORTÍ, G.; MEYER, A. Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. **Molecular Biology and Evolution**, v.13, p.556-573. 1996.
- PALUMBI, S. R. *et al.* The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0, privately published document compiled by S. Palumbi. Dept. **Dept Zoology, Univ. Hawaii, Honolulu**, 1991.
- PALUMBI, S. R. The Polymerase Chain Reaction. **Molecular Systematics**, p. 655, 1996.
- PAULA, F. M. DE. **Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do**

**complexo Canoas-rio Paranapanema.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina .Londrina/PR.2006.

PEREIRA, L. H. G. *et al.* Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**,v.14,n.20,p.1471-2156. 2013.

PIORSKI, N. M. Diversidade genética e filogeografia das espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 no nordeste do Brasil. **Tese Doutorado em Ciências Biológicas.Área de concentração: Genética e Evolução.**Universidade Federal de São Carlos.2010.

PIORSKI, N. M.; CASTRO, A. C. L.; SOUSA NETO, M. A. S. Peixes do cerrado da Região sul Maranhenses. **Ed.USEB**,378p.2007.

PONZETTO, S. P.; STRUBE, M. Taxonomy induction based on a collaboratively built knowledge repository. **Artificial Intelligence**, 2011.

REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, 2016.

REIS, L. L. **Variabilidade populacional de *Pimelodus blochii* (Pimelodidae: Siluriformes) em bacias hidrográficas maranhenses através do DNA mitocôndrial.** Monografia (graduação) – Universidade Estadual do Maranhão, CESC/UEMA, Caxias. 2011.

SALES, N. G., PESSALI, T. C., ANDRADE NETO, F. R., and CARVALHO, D. C. Introgression from non-native species unveils a hidden threat to the migratory Neotropical fish *Prochilodus hartii*. **Biol. Invasions**. 20, 555–566.2018. doi: 10.1007/s10530-017-1556-4.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1977.doi:1091-64-90.

SANTOS, G. M. *et al.* Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí. **Eletronorte**,Brasília.216p.2004.

SANTOS, R. S. **Levantamento da ictiofauna da bacia do rio Itapecuru e Caracterização molecular do *Sorumbi lima* (Pimelodidae) em diferentes bacias do estado do Maranhão.** 28f. Monografia (graduação). Universidade Estadual do Maranhão, CESC/UEMA, Caxias. 2009.

SANTOS, G. M. DOS *et al.* Peixes comerciais de Manaus. **Zhurnal Eksperimental’noi i Teoreticheskoi Fiziki**, 2006.

SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. **Genetic differentiation of Macrodon**

**ancylodon (Sciaenidae, perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis***Genetics and Molecular Biology*, 2003.

SIDLAUSKAS, B. Continuous and arrested morphological diversification in sister clades of characiform fishes: A phylomorphospace approach. *Evolution*, v.62,p.3135-3156.2008. doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00519.x.

SILVA, A. P. DA; UMMUS, M. E.; TARDIVO, T. F. Produção e sazonalidade das principais espécies capturadas pela pesca artesanal no rio Araguaia/TO. **Embrapa Pesca e Aquicultura. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2017.

SILVA, F. C.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. Sistemática molecular de Curimatá (*Prochilodus*, Prochilodontidae) de bacias hidrográficas do norte e nordeste. In: **63<sup>a</sup> SBPC - Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**. Goiânia. 2011.

SILVA, L. M. M. **Caracterização molecular e variabilidade genética de peixes da família Anostomidae da bacia do rio Itapecuru**. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual do Maranhão, CESC/UEMA, Caxias. 2008.

SILVA, M. M. L.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. Identificação do estoque de curimatá da bacia do rio Itapecuru/MA a partir de marcadores moleculares. In: **54<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética**, Salvador. 2008.

SILVA, L. M. M. **Caracterização molecular e variabilidade genética de peixes da família Anostomidae da bacia do rio Itapecuru**. Monografia ( Graduação)- Universidade Estadual do Maranhão, CESC/UEMA, Caxias. 2008.

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

SIROL, R.N.; BRITTO, S.G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Eds.). **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas**. São Carlos: RiMA, 2006. p.275-284.

SOARES, A. A. **Estudos filogenéticos na superfamília Loricarioidea (Teleostei: Siluriformes) com base em sequencias do DNA nuclear e mitocondrial**. Tese de Doutorado. Botucatu:UNESP. 2008.

SMITH, M. F.; PATTON, J. L. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. **Biological**

**Journal of the Linnean Society**, 1993.

SOARES, E. C. **Peixes do Mearim, Fish of the Mearim River**. São Luis: Instituto Geia. 143p. 2005.

SUDENE. **Projeto Itapecuru**. 1997.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 1989.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0. *Mol. Biol. Evol.* **Molecular Biology and Evolution**, 2013.

TAPHORN, D. C. The characiform fishes of the Apure River drainage. **BioLlania. Edición especial**, v. 4, p. 516–533, 1992.

TEIXEIRA, S. G.; SOUZA FILHO, P. W. M. Mapeamento de ambientes costeiros tropicais (Golfo Maranhense, Brasil) utilizando imagens de sensores remotos orbitais. **Revista Brasileira de Geofísica**, 2009.

TURNER, T. *et al.* Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. **Journal of Fish Biology**, n.64, p.186-201. 2004. doi:10.1111/j.10958649.2004.00299.x.

VARI, R. P. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v.378, p.1-60. 1983.

VIEGAS, J. C.; PASSOS, M. M. RODRIGUES, T. C. S. PEREIRA, P. R. M. GERAÇÃO SEMIAUTOMÁTICA DE DADOS MORFOMÉTRICOS: proposta para os novos limites do divisor de água e altimetria da Bacia Hidrográfica do Pericumã – Maranhão, BRASIL. *In: Anais da I Jornadas Lusófonas de Ciências e Tecnologias de Informação Geográfica*. 2014.

WARD, R. D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, B.n.359, p.1847-1857. 2005.

ZANATA, A.M., VARI, R.P. The family Alestidae (Ostariophysi, Characiformes): a phylogenetic analysis of a trans-Atlantic clade. **Zool. J. Linnean Soc.**, v. 145, p. 1–144, 2005.

**ANEXO**

**Protocolo de extração de Kit PROMEGA**

- Retirou-se um fragmento de 200mg do tecido;
- Preparou-se solução composta de EDTA- 0,5M (60µl) e Nuclei Lysis Solution (250µl);
- Levou-se a solução ao freezer por 5min (Proporcional à quantidade dos reagentes), tomando cuidado para não congelar;
- Para cada µl de amostra, usou-se 300µl da solução preparada para cada tubos;
- Colocou-se 15µl de proteinase K e deixou-se a amostra em banho maria a 65°C até degradar todo o tecido (mais ou menos três horas, dependendo do tipo de tecido);
- Adicionou-se 10µl de RNase Solution e levou-se os tubos á estufa a 37°C por 30min;
- Após retirar as amostras da estufa adicionou-se 150µl do reagente Protein Precipitation Solution;
- Agitou-se delicadamente os tubos;
- Agitou-se em vórtex para garantir a homogeneização dos reagentes;
- Colocou-se em no freezer por cinco minutos;
- Centrifugou-se por 10 min a 15.000 rpm;
- Adiciou-se 600µl de isopropanol;
- Retirou-se o sobrenadante do material centrifugado, colocando junto com o isopropanol;
- Centrifugou-se por 10min a 15.000rpm;
- Descartou-se o sobrenadante cuidadosamente;
- Adicionou-se 500µl de etanol a 70%;
- Centrifugou-se por 10min a 15.000rpm;
- Descartou-se o sobrenadante e colocou-se o tubo para secar em estufa a 37° por 1min
- Colocou-se 50µl de solução DNA rehydratation ou TE;
- Deixou-se em overnight no freezer para posterior quantificação
- O DNA foi visualizado em gel de agarose a 1% em uma proporção de 3µl do tampão (azul de bromofeno e xilenocianol) para 5µde DNA.

### **Protocolo para Reação em Cadeia de Polimerase ( PCR)**

A PCR foi realizada em volume total final de 25µl, com os seguintes reagentes;

- ✓ 4µl de DNTPs (1,25mM) (nucleotídios)
- ✓ 2,5µl de solução tampão de 10X buffer (200mM Tris-Hcl,pH 8.4 and 500mM Kcl)
- ✓ 1µl de solução de MgCl<sub>2</sub> (50mM)
- ✓ 1 µl de DNA (250ng/ µl)
- ✓ 0,25 µl de cada primer (200ng/ µl)
- ✓ 0,2 µl da enzima Taq polimerase (5U/µl)
- ✓ Água purificada para completar o volume final da reação.

Para a amplificação dos fragmentos das três regiões do genoma mitocondrial (rRNA16S, COI, Cyt *B*) e do gene do DNA nuclear (TROP), foram usados primers e condições específicas conforme descrita na tabela 2.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% em uma proporção de 3 µl do tampão (azul de bromofenol e xilenocionol) para cada 5 µl de PCR o produto positivo da PCR foi purificado com enzimas ExoSAP-IT conforme recomendações do fabricante e levado a reação de sequência.

**Após a reação de sequenciamento o produto foi submetido a precipitação de acordo com os seguintes estágios:**

- Submeteu-se a placa a um spin (Centrifugar a placa);
- Adicionou-se 2,5 µl de EDTA (125mM);
- Vedou-se a placa e submeteu-se a um spin;
- Adicionou-se 30 µl de Etanol 100;
- Vedou-se a placa e misturou-se invertendo 4-5x;
- Envolveu-se a placa em papel alumínio e deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 15 min (Centrifuga refrigera 4°C);
- Centrifugou-se a 4.000 rpm por 30 min;
- Inverteu-se bruscamente a placa para descartar o álcool e secou-se sobre o papel absorvente;
- Centrifugou-se a placa invertida por 1min a 1.150rpm;
- Adicionou-se 30 µl de etanol a 70%;
- Vedou-se a placa;

- Centrifugou-se a 3.440 rpm por 15min (centrifuga resfriada 4°C);
- Inverteu-se bruscamente a placa para descarta o álcool e secou-se sobre papel absorvente;
- Centrifugou-se a placa invertida por 1min a 1.150rpm;
- Deixou-se a placa na estufa a 37°C por aproximadamente 10min para evaporar excesso de álcool.
- Adicionou-se formamida
- Levou-se ao termociclador por 3 minuto
- Levou-se ao sequenciador automático de DNA.

### **Protocolo de sequenciamento**

- Submeteu-se a placa a um spin (centrífuga de placa);
- Adiciou 2,5µl de EDTA (125 mM);
- Vedou-se a placa e submeter a um spin;
- Adicionar 30µl de Etanol 100%;
- Vedar a placa e misturar invertendo 4-5x;
- Cobriu-se a placa com papel alumínio e deixou em repouso em temperatura ambiente por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4° C);
- Centrifugou-se a 4.000 rpm por 30 minutos;
- Inverteu-se bruscamente a placa para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- Centrifugou-se a placa invertida por 1 minutos a 1.150 rpm;
- Adicionou 30µl de Etanol a 70%;
- Vedou-se a placa;
- Centrifugou se a 3.440 rpm por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4° C);
- Inverteu-se bruscamente para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- Centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;
- Deixou-se a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool.