



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

**COMPARAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA  
POPULACIONAL DE *Plagioscion squamosissimus* (HAEKEL,  
1840) E *P. auratus* (CASTELNAU, 1855) (PERCIFORMES,  
SCIAENIDAE) ATRAVÉS DA ANÁLISE DO DNA  
MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

DOUGLAS FARLEY BARROSO PEREIRA

Santarém- Pará  
Agosto, 2011

**DOUGLAS FARLEY BARROSO PEREIRA**

**COMPARAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA  
POPULACIONAL DE *Plagioscion squamosissimus* (HAEKEL,  
1840) E *P. auratus* (CASTELNAU, 1855) (PERCIFORMES,  
SCIAENIDAE) ATRAVÉS DA ANÁLISE DO DNA  
MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SIMÔNI SANTOS DA SILVA.

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, junto ao Programa de Pós- Graduação *Strictu Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Conservação e Manejo da Biodiversidade na Amazônia.

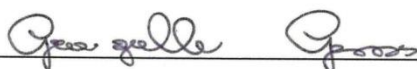
**Santarém- Pará  
Agosto, 2011**

**COMPARAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA  
POPULACIONAL DE *Plagioscion squamosissimus* (HAEKEL,  
1840) E *P. auratus* (CASTELNAU, 1855) (PERCIFORMES,  
SCIAENIDAE) ATRAVÉS DA ANÁLISE DO DNA  
MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, Área de concentração: Conservação e Manejo da Biodiversidade na Amazônia. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós- graduação em Recursos Naturais a Amazônia, nível mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, em **02 de agosto de 2011.**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Helena Veras Mourão (UFOPA)  
Coordenadora do PGRNA

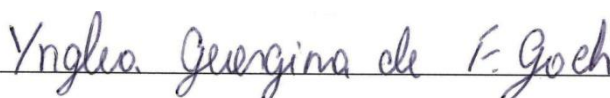
Apresentada à Comissão Examinadora, integrada pelos Professores:



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Grazielle Fernanda Evangelhista Gomes- UFPA  
Examinadora 01



Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues- UFOPA  
Examinador 02



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ynglea Georgina Goch de Freitas- UFOPA  
Examinadora 03



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simôni Santos da Silva- UFOPA  
Orientadora

Santarém, Agosto, 2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca Ruy Barata/UFOPA**

P436 c PEREIRA, Douglas Farley Barroso  
COMPARAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA POPULACIONAL DE  
*Plagioscion squamosissimus* (HAEKEL, 1840) E *P. auratus* (CASTELNAU, 1855)  
(Perciformes, Sciaenidae) ATRAVÉS DA ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL E  
NUCLEAR.- Santarém, 2011.  
53 f.: il.  
Inclui bibliografias.  
Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Oeste do Pará, 2011.  
Orientadora: Simôni Santos da Silva  
1. Região controle do DNAm 2. Sciaenidae 3. TMO-4C4 do DNA nuclear  
CDD: 21 ed. 597.725

## DEDICATÓRIA

À família Pereira,  
em especial a minha esposa Tatiana  
e aos nossos filhos João Pedro e Luís Eduardo.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Simôni Santos da Silva pelo valioso auxílio na orientação desta pesquisa;

Ao CNPq por fomentar a realização desta pesquisa;

Aos membros da banca examinadora Dra. Grazielle Gomes, Dra. Ynglea Goch e Dr. Luís Reginaldo Rodrigues por aceitarem fazer parte deste importante momento da minha formação;

À coordenação do Curso de Mestrado, em especial à professora Dra. Rosa Helena Veras Mourão;

Aos presidentes e pescadores das colônias de pescadores dos municípios de Alenquer, Juruti, Monte Alegre, Santarém e Bragança, pelo apoio durante as coletas;

Ao Instituto de Estudos Costeiros da UFPA, Campus de Bragança, pela estrutura laboratorial;

Ao professor M.Sc. Hudson Cleber Pereira da Silva pelo auxílio na elaboração do abstract;

Aos Professores do mestrado: Dr. Antônio Lola, Dr<sup>a</sup>. Iracilda Sampaio, Dr. Keid Nolan, Dr. Reinaldo Peleja, Dr. Rodrigo Silva, Dr. Ricardo Bezerra e Dr<sup>a</sup>. Raimunda Monteiro pelas contribuições à minha formação profissional;

Aos colegas da primeira turma de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia da UFOPA: Cristiano Santana, Diego Marques, Diego Pimentel, Francisco Araújo, Juliano Gallo, Patrick Lobato, Paulo Uchôa, Ricardo Flávio e Sandra Sarrazin pelos momentos de convivência e aprendizado;

Às colegas de Bragança: Fátima Cunha, Salene Alencar, Yrlene Ferreira, Cássia Rocha, Elba Neves e Manoela Carneiro pela ajuda na parte laboratorial durante a pesquisa;

À Secretaria de Estado de Educação do Estado do Pará e Secretaria Municipal de Educação de Oriximiná pela licença estudo e apoio a minha formação continuada;

Aos meus pais Dário Ataíde Pereira e Francisca Barroso Pereira pelo carinho e incentivo;

Aos meus irmãos Dilson, Dirce, Dora, Dulcemer, Darinho, Deco, Dailton, Dalva, Delson, Daniela, Danilo e Diane pelo apoio familiar indispensável;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

PEREIRA, Douglas Farley Barroso. 2011. 53 páginas. **Comparação da diferenciação genética populacional de *Plagioscion squamosissimus* (Haekel, 1840) e *P. auratus* (Castelnau, 1855) (Perciformes, Sciaenidae) através da análise do dna mitocondrial e nuclear.** Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Pará-UFOPA, Santarém, 2011.

## RESUMO

A pescada branca e a pescada preta, *Plagioscion squamosissimus* e *P. auratus*, respectivamente, são peixes da família Sciaenidae que habitam os rios de água doce da América do Sul e que ocorrem em simpatria na bacia Amazônica. Ambas são consideradas espécies válidas apoiadas por dados morfológicos, mas estudos moleculares recentes revelaram total similaridade entre as duas espécies à nível da Citocromo Oxidase subunidade I do DNA mitocondrial e Tmo-4C4 do DNA nuclear. Com o objetivo de avaliar o status taxonômico das duas espécies bem como suas diversidades genéticas e estruturação populacional foram avaliados 199 exemplares, sendo 108 de *P. squamosissimus* e 91 de *P. auratus* nos municípios paraenses de Santarém, Alenquer, Juruti, Monte Alegre e Bragança. Um fragmento de 644 pb da região controle foi analisado de todos os exemplares coletados, e 432 pb do gene nuclear Tmo-4C4 de 40 indivíduos de *P. squamosissimus* e 30 de *P. auratus* foram comparados. As árvores filogenéticas, para os dois marcadores, separaram os dois táxons em clados reciprocamente monofiléticos com altos valores de *bootstrap* confirmando o *status* de espécie para *P. squamosissimus* e *P. auratus*. Similarmente as análises populacionais interespecíficas corroboram a manutenção dos táxons como espécies distintas. As análises intraespecíficas da região controle revelaram que, associando diversidade genética e história demográfica, as populações de pescadas brancas e pretas do médio Amazonas apresentam padrões típicos de populações estáveis com longa história evolucionária. A população de pescada preta de Bragança passou por um gargalo populacional devido ao efeito de fundador, o qual pode ter sido produzido por introdução antrópica recente no estuário do rio Caeté. A pescada branca é constituída por populações conectadas por fluxo gênico mediado por fêmeas ao longo da calha do Amazonas, assim como a pescada preta, a qual deve ser considerada em panmixia no médio Amazonas. A diferenciação genética da pescada preta de Bragança em relação às demais populações desta espécie pode ser devido à deriva genética randômica promovida pelo efeito de fundador, uma vez que o compartilhamento de haplótipos desta com populações do médio Amazonas sugerem que ela teve origem a partir de indivíduos daquela área. Finalmente, o padrão de homogeneidade genética observada para as duas espécies pode estar relacionado aos pulsos de inundação que conectam lagos e tributários da calha principal do Amazonas durante os períodos de cheia da várzea amazônica. Estes resultados podem ser utilizados para planos de manejo destes dois importantes recursos pesqueiros da região Amazônica.

Palavras- chave: Região controle do mtDNA. Sciaenidae. Tmo-4C4 do DNA nuclear.

PEREIRA, Douglas Farley Barroso. 2011. 53 páginas. **Comparação da diferenciação genética populacional de *Plagioscion squamosissimus* (Haekel, 1840) e *P. auratus* (Castelnau, 1855) (Perciformes, Sciaenidae) através da análise do dna mitocondrial e nuclear.** Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Pará-UFOPA, Santarém, 2011.

## ABSTRACT

The silver and black croakers, *Plagioscion squamosissimus* and *P. auratus* respectively, are fishes belonging to the Sciaenidae family inhabiting South America freshwaters drainages, occurring in sympatry in the Amazonian flood plain. Morphologically, both species are validated, however, recent studies revealed a complete similarity between species at the COI mitochondrial DNA and the nuclear Tmo-4C4 DNA. Aiming to evaluate the taxonomic status of both species, as well as their genetic diversity and population structure, we evaluated 199 specimens, with 108 for *P. squamosissimus* and 91 for *P. auratus* at the Pará state cities such as Santarém, Alenquer, Juruti, Monte Alegre and Bragança. A partial fragment with 644 bp of the control region was analyzed from all the sampled specimens, and 432 bp of the nuclear Tmo-4C4 DNA for 40 individuals of *P. squamosissimus* and 30 specimens of *P. auratus* were compared. Phylogenetic trees, for the two markers, separate the two taxa in reciprocally monophyletic clades with high bootstrap values confirming the status of species for *P. squamosissimus* and *P. auratus*. Similarly, interspecific population analyses corroborate the maintenance of the taxa as distinct species. Interspecific analyses of the control region revealed that associating genetic diversity and demographic history, the populations of silver and black croakers of the medium Amazon region show typical patterns of stable populations with long evolutionary history. The population of black croaker from Bragança has passed through bottleneck due to a founder effect, which may have been produced by anthropic introduction at the Caeté estuary. The silver croaker is constituted for populations connected by gene flow mediated by females along of the main channel of the Amazon River, as well as for black croaker which might be considered panmictic at the Medium Amazon region. The genetic differentiation of black croaker from Bragança in relation to the other populations of this species might be attributed to the random genetic drift promoted by the founder effect, once the sharing of haplotypes of this with populations from the Medium Amazon region suggest a origin from individuals from that area. Finally, the pattern of genetic homogeneity observed for the both species may be related to the flood pulses connecting lakes and tributaries of the main channel of the Amazon River during the period of high waters of Amazonian *várzea*. These results may be used for management plans of those two important fish resources at the Amazon region.

Key-Words: Control region of the mtDNA. Sciaenidae. Tmo-4C4 of the nuclear DNA.



## SUMÁRIO

|  |             |
|--|-------------|
| <b>RESUMO</b> .....  | <b>v</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>vi</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | <b>ix</b>   |
| <b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | <b>ix</b>   |
| 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 11          |
| 1.1.1 Aspectos gerais da família Sciaenidae (Owen, 1846).....                              | 11          |
| 1.1.2 Gênero <i>Plagioscion</i> (Gill, 1861) .....   | 11          |
| 1.1.3 <i>Plagioscion squamosissimus</i> (Haeckel, 1840).....                               | 12          |
| 1.1.4 <i>Plagioscion auratus</i> (Castelnau, 1855).....                                    | 15          |
| 1.1.5 O DNA mitocondrial e o uso da região controle em estudos moleculares de peixes ..... | 17          |
| 1.1.6 O DNA nuclear e o uso da região tmo-4c4 em estudos moleculares de peixes.....        | 19          |
| 1.1.7 Justificativa .....  | 21          |
| 1.2 OBJETIVOS .....  | 21          |
| 1.2.1 Objetivo geral.....  | 21          |
| 1.2.2 Objetivos específicos .....  | 21          |
| <b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>23</b>   |
| 2.1 AMOSTRAGEM.....  | 23          |
| 2.2 EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES GENÔMICAS .....             | 24          |
| 2.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E POPULACIONAIS.....  | 25          |
| <b>3 RESULTADOS</b> .....  | <b>28</b>   |
| 3.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E DE DIVERGÊNCIA NUCLEOTÍDICA .....                             | 28          |
| 3.2 ANÁLISES POPULACIONAIS .....   | 33          |
| 3.2.1 Análise interespecífica .....  | 33          |
| 3.2.2 Análises intraespecífica .....   | 34          |
| 3.2.2.1 <i>Plagioscion squamosissimus</i> .....  | 34          |
| 3.2.2.2 <i>Plagioscion auratus</i> .....   | 37          |
| <b>4 DISCUSSÃO</b> .....   | <b>41</b>   |
| 4.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E POPULACIONAIS INTERESPECÍFICAS .....                          | 41          |
| 4.2 ANÁLISES POPULACIONAIS INTRAESPECÍFICAS .....  | 42          |
| <b>5 CONCLUSÕES</b> .....  | <b>47</b>   |
| <b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>48</b>   |

## LISTA DE TABELAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Locais de coleta e número amostral de <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>P. auratus</i> ..   | <b>24</b> |
| <b>Tabela 2.</b> Sítios variáveis da região controle do DNAm de <i>P. squamosissimus</i> . .....  | <b>29</b> |
| <b>Tabela 3.</b> Sítios variáveis da região controle do DNAm para <i>P. auratus</i> .....   | <b>30</b> |
| <b>Tabela 4.</b> Análise de variância molecular (AMOVA) para as populações de <i>Plagioscion squamosissimus</i> e <i>Plagioscion auratus</i> . .....  | <b>34</b> |
| <b>Tabela 5.</b> Índice de fixação ( $F_{ST}$ ) entre os pares de populações de <i>P. squamosissimus</i> e <i>P. auratus</i> .....  | <b>34</b> |
| <b>Tabela 6.</b> Índices de diversidade genética e testes de neutralidade para populações de <i>P. squamosissimus</i> . .....   | <b>35</b> |
| <b>Tabela 7.</b> Análise da variância molecular (AMOVA) para as populações de <i>Plagioscion squamosissimus</i> . A estrutura de grupo testada foi um grupo constituído por populações de Santarém, Alenquer, Monte Alegre e Juruti. .... | <b>35</b> |
| <b>Tabela 8.</b> Índice de fixação ( $F_{ST}$ ) entre os pares de populações de <i>P. squamosissimus</i> . .....  | <b>35</b> |
| <b>Tabela 9.</b> Parâmetros do modelo de expansão súbita e <i>goodness-of-fit</i> para <i>P. squamosissimus</i> . .....   | <b>37</b> |
| <b>Tabela 10.</b> Índices de diversidade genética para populações de <i>Plagioscion auratus</i> . .....   | <b>38</b> |
| <b>Tabela 11.</b> AMOVA para as populações de <i>P. auratus</i> . A estrutura de grupo testada foi: um grupo constituído por populações dos municípios de Santarém, Alenquer e Bragança.....  | <b>38</b> |
| <b>Tabela 12.</b> Índice de fixação ( $F_{ST}$ ) entre os pares de populações de <i>P. auratus</i> . .....  | <b>39</b> |
| <b>Tabela 13.</b> Parâmetros do modelo de expansão súbita e <i>goodness-of-fit</i> para <i>P. auratus</i> . .....   | <b>40</b> |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécime de *P. squamosissimus*. ..... 13
- Figura 2.** Distribuição de *P. squamosissimus*. Os números são os locais de ocorrência da espécie: 1- rio Orinoco; 2- rio Negro; 3- rio Trombetas; 4- rio Amazonas; 5- rio Tapajós; 6- rio Madeira; 7- rio São Francisco; 8- rio Paraguai; 9- rio Paraná; 10- rio Uruguai. .... 14
- Figura 3.** Produção da pesca extrativa continental de pescada branca no estado do Pará..... 15
- Figura 4.** Espécime de *P. auratus*. ..... 16
- Figura 5.** Distribuição de *P. auratus*. Os círculos pretos correspondem ..... 17  
aos locais de ocorrência da espécie. .... 17
- Figura 6.** Genoma mitocondrial de vertebrados. .... 18
- Figura 7.** Mapa mostrando os pontos de coletas de *P. squamosissimus* e *P. auratus*. ..... 23
- Figura 8.** Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de 644 pb da região controle do DNA mitocondrial de *P. squamosissimus* e *P. auratus* a partir do modelo K2P (Kimura, 1980). O grupo externo é *Cynoscion acoupa* representado na árvore como Cac335 e foi retirado do Genbank (número de acesso: EU562598). Valores acima dos ramos são o suporte estatístico obtidos para 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Siglas: Psq- *Plagioscion squamosissimus*, Pau- *Plagioscion auratus*; Stm- Santarém, Alq- Alenquer, Mon- Monte Alegre, Jur- Juruti e Brg- Bragança. .... 31
- Figura 9.** Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de 432 pb da região nuclear Tmo-4C4 de *P. squamosissimus* e *P. auratus* a partir do modelo K2P. Grupos externos são *Isopisthus parvipinnis* (IpaPA2), *Macrodon ancylodon* (ManPA46) *Pachyurus* sp. (PacspPA22) e *Cynoscion acoupa* (CacPA337). Acima do ramo está o suporte estatístico para os agrupamentos, este foi obtido com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Siglas: Psq- *Plagioscion squamosissimus*, Pau- *Plagioscion auratus*; Stm- Santarém, Alq- Alenquer, Mon- Monte Alegre, Jur- Juruti e Brg- Bragança. .... 32
- Figura 10.** Rede de haplótipos baseada nos sítios polimórficos da região controle do DNA mitocondrial de *P. squamosissimus* (círculos cinzas) e *P. auratus* (círculos pretos). Áreas dos círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos, 417 é o número de mutações que separa os haplogrupos das duas espécies. .... 33
- Figura 11.** Rede de haplótipos baseada nos sítios polimórficos da região controle do DNAm de *P. squamosissimus*. Áreas dos círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos e os traços indicam o número de mutações entre cada haplótipo. .... 36
- Figura 12.** Distribuição *mismatch* das diferenças par a par entre os pares de haplótipos para as populações de *P. squamosissimus* de Santarém (a), Alenquer (b), Monte Alegre (c) e Juruti(d). .... 37

**Figura 13.** Rede de haplótipos baseada nos sítios polimórficos da região controle do DNA mitocondrial de *P. auratus*. Áreas dos círculos são proporcionais a frequência dos haplótipos e os traços indicam o número de mutações. .... **39**

**Figura 14.** Distribuição das diferenças par a par entre os pares de haplótipos para as populações de *P. auratus* de Santarém (a), Alenquer (b) e Bragança (c). .... **40**

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 Aspectos gerais da família Sciaenidae (Owen, 1846)

Sciaenidae é uma família da ordem Perciformes, que apresenta distribuição mundial, contém cerca de 70 gêneros e 280 espécies que habitam regiões marinhas e estuarinas dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (Nelson, 2006). As espécies dos gêneros *Aplodinotus*, *Pachypops*, *Pachyurus*, *Petilipinnis* e *Plagioscion* são habitantes de água doce no Novo Mundo podendo também ocorrer em estuários, sendo que os quatro últimos gêneros ocorrem na América do Sul (Casatti, 2005; Nelson, 2006).

Os cianídeos são caracterizados pela presença de nadadeira dorsal longa, com um entalhe profundo que separa espinhos da porção mole, a primeira com 6-13 espinhos e a segunda com um espinho e, geralmente, 20-35 raios moles; nadadeira anal com um ou dois espinhos e escamas na linha lateral estendendo-se até o final da nadadeira caudal; nadadeira caudal ligeiramente emarginada a arredondada; barbilhão único ou barbilhões pequenos na maxila inferior de algumas espécies; cabeça com grandes canais cavernosos (parte do sistema da linha lateral); 20-30 vértebras, poros conspícuos no nariz e maxilar inferior, vômer e palatino sem dentes; otólitos excepcionalmente grandes, bexiga natatória (raramente rudimentar em adultos) geralmente muito ramificada, sendo uma das características amplamente utilizadas para ajudar a distinguir gêneros e espécies (Chao, 1978; Menezes e Figueredo, 1980; Casatti, 2005; Nelson, 2006).

### 1.1.2 Gênero *Plagioscion* (Gill, 1861)

*Plagioscion* é um gênero de água doce endêmico da América do Sul (Casatti, 2003). Comparado a outros gêneros de cianídeos de água doce é o mais comum e importante recurso pesqueiro na bacia amazônica (Ferreira *et al.*, 1998).

Na mais recente revisão do gênero realizada por Casatti (2005) foram reconhecidas cinco espécies: *Plagioscion squamosissimus*, amplamente distribuída em drenagens do Atlântico a leste dos Andes; *P. auratus* que ocorre no rio Orinoco e rios da bacia amazônica; *P. magdalena* do rio Magdalena e rios da bacia amazônica; *P. ternetzi* do baixo rio Paraná, rio Paraguai e bacias do rio Uruguai; e *P. montei* em rios da bacia Amazônica.

Algumas espécies de *Plagioscion*, principalmente *P. squamosissimus*, possuem notável importância econômica na região Amazônica e em áreas onde estas foram introduzidas.

Há inúmeras discordâncias entre os autores quanto ao número exato de espécies pertencentes ao gênero *Plagioscion* (Ferreira *et al.*, 1998; Froese e Pauly, 2010). A revisão do gênero *Plagioscion* feita por Casatti (2005) analisando caracteres morfométricos e merísticos, considerou que, entre as 15 espécies nominais atribuídas ao gênero, apenas cinco são válidas: *Plagioscion squamosissimus*, *P. auratus*, *P. magdalenae*, *P. ternetzi* e *P. montei*. Oito espécies foram consideradas como sinonímia junior: *Johnius crouvina* (sin. de *P. squamosissimus*), *J. amazonicus* (sin. de *P. squamosissimus*), *P. casattii* (sin. de *P. squamosissimus*), *P. squamosissimus iquitensis* (sin. de *P. squamosissimus*), *Pseudosciaena surinamensis* (sin. de *P. squamosissimus*), *P. auratus iquitensis* (sin. de *P. squamosissimus*), *Corvina monacantha* (sin. de *P. auratus*), *P. macdonaghi* (sin. de *P. ternetzi*). Duas espécies *P. pauciradiatus* e *Sciaena rubella* continuaram com *status* taxonômico incertos porque os tipos não foram encontrados e as descrições originais são insuficientes para alocá-las em qualquer espécie de *Plagioscion* conhecida.

Estudos filogenéticos utilizando sequências de DNA mitocondrial (DNAMt) citocromo oxidase C subunidade I e da região nuclear Tmo-4C4 de *P. squamosissimus* e *P. auratus* (Cunha, 2007; Ferreira, 2008) *Plagioscion squamosissimus* e *P. auratus* são grupo irmãos apoiados por elevado suporte estatístico e formam um clado com *P. magdalenae*. Também nos resultados gerados por esses autores, as sequências de ambos os táxons foram 100% similares o que reforçou a proposição de que estes eram uma única espécie com variação de caracteres fenotípicos, principalmente no que se refere à coloração. Por outro lado, estudos recente sobre a filogenia dos cianídeos do oeste do Atlântico, utilizando os marcadores mitocondriais COI e 16S, além do marcador nuclear Tmo-4C4, *P. auratus* é grupo irmão de *P. magdalenae* e estes formam um clado com *P. squamosissimus* (Simôni Santos, comm. pess.).

### 1.1.3 *Plagioscion squamosissimus* (Haeckel, 1840)

*P. squamosissimus* (Figura 1), conhecida popularmente como pescada branca, pescada do Piauí ou corvina é uma espécie de grande porte, podendo alcançar até 80 cm de comprimento (Casatti, 2003).

A espécie é caracterizada por apresentar ânus próximo à origem da nadadeira anal (distância ânus a nadadeira anal dividido pelo comprimento da cabeça (HL- *head length*);

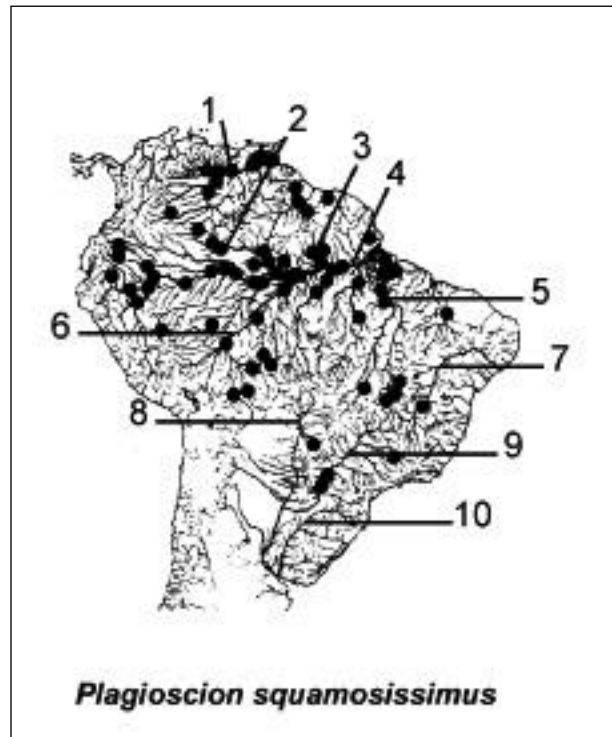
diâmetro horizontal da órbita dividido pelo comprimento da cabeça: 3,8-5,4; largura interorbital estreita (2,8-4,8 em HL); nadadeira peitoral curta (3,8-4,7 dividida pelo comprimento padrão); nadadeira anal curta (média de 3,9 em HL); menos da metade dos raios moles da nadadeira dorsal coberta com escamas (geralmente 1-5 séries longitudinais); grandes dentes cônicos na série interna da pré-maxila (Casatti, 2005).



**Figura 1.** Espécime de *P. squamosissimus*. (Foto: Douglas Pereira)

A pescada branca é amplamente distribuída nos rios da América do Sul, ocorrendo no rio Orinoco, rios das Guianas e do Brasil (Figura 2). No Brasil a espécie ocorre na bacia Amazônica, Tocantins-Araguaia e em áreas onde foi introduzida como nas bacias do São Francisco, Prata, Rio Paraná e açudes do Nordeste (Agostinho *et al.*, 2004, Dourado, 1976).

A espécie possui habitat bentopelágico e ocupa variados biótopos, é carnívora sendo que os juvenis se alimentam de larvas de camarões, insetos aquáticos e copépodos enquanto que os adultos se alimentam principalmente de peixes (Froese e Pauly, 2010).



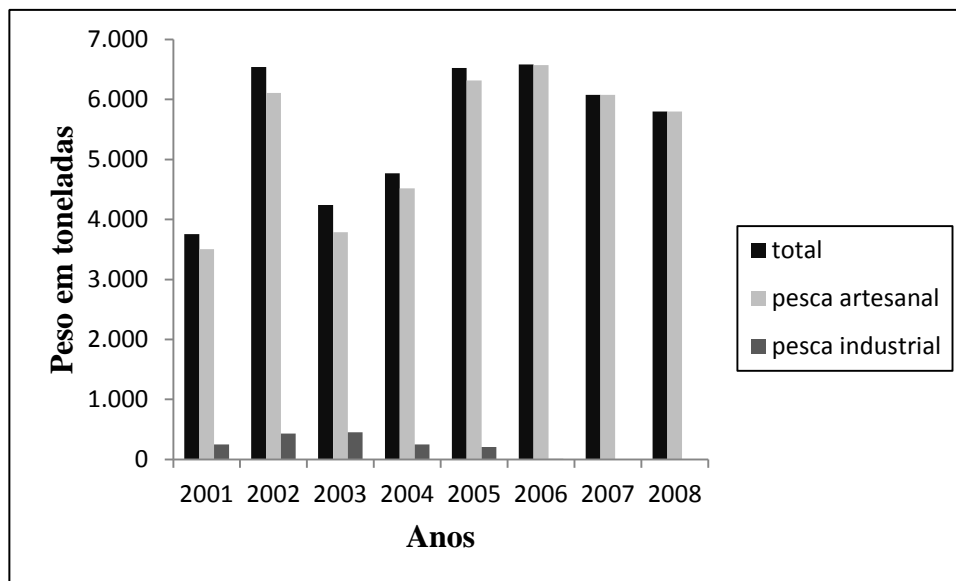
**Figura 2.** Distribuição de *P. squamosissimus*. Os números são os locais de ocorrência da espécie: 1- rio Orinoco; 2- rio Negro; 3- rio Trombetas; 4- rio Amazonas; 5- rio Tapajós; 6- rio Madeira; 7- rio São Francisco; 8- rio Paraguai; 9- rio Paraná; 10- rio Uruguai. (Fonte: Casatti, 2005)

Estudos sobre a biologia reprodutiva de *P. squamosissimus* evidenciam que há variação de tamanho dos indivíduos, em função do ambiente em que as populações estão distribuídas. Rodrigues *et al.* (1988) estimaram que a primeira maturação gonadal da espécie na represa Bariri, no rio Tietê, São Paulo, ocorre com 20,6 cm para fêmeas e 18,2 cm para machos. Castro (1999) em estudo na represa de Barra bonita, São Paulo, estimou que 100% dos machos com 28,3 cm e fêmeas com 27,0 cm estão aptos a participar do processo reprodutivo. Barbosa (2009) estimou que no Rio Pará, no município de Barcarena-PA, ambiente de ocorrência natural da espécie, a primeira maturação sexual ocorre com 14 cm e 21,43 cm para fêmeas e machos, respectivamente.

*P. squamosissimus* é um importante recurso pesqueiro na região amazônica sendo a espécie mais comercializada nos mercados do baixo e médio Amazonas (Ferreira *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2006). De acordo com os dados de estatísticas de pesca extrativista das espécies de água doce, divulgados pelo Instituto Brasileiro dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a pescada é uma das mais comercializadas no Pará, onde foram comercializadas ao longo de oito anos (2001-2008) 44.282 toneladas (t) deste recurso, sendo os anos de 2002, 2005, 2006, 2007 e 2008 os que apresentaram maior produção (Figura 3). A estatística pesqueira do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2010) dos anos de 2008 a 2009



mostram que 5% da pesca extrativa continental de água doce brasileira daquele período, um total de 39.194 t, foi constituído de pescada, sendo esta uma das cinco espécies mais comercializadas. Porém, é importante considerar que os dados do IBAMA e MPA servem apenas como estimativa da produção da pescada branca, uma vez que várias espécies de *Plagioscion* e até outros gêneros de cianídeos de água doce, são incluídos na categoria definida como pescada por estes órgãos.



**Figura 3.** Produção da pesca extrativa continental de pescada branca no estado do Pará (Fonte: IBAMA/MMA, 2001-2009).

#### 1.1.4 *Plagioscion auratus* (Castelnau, 1855)

*P. auratus* (Figura 4), conhecida popularmente como pescada-preta é uma espécie de médio porte, alcança mais de 30 cm de comprimento (Casatti, 2003) caracterizada basicamente pela combinação dos caracteres: ânus distante da origem da nadadeira anal; diâmetro horizontal da órbita em HL 5,0-6,2; ampla largura interorbital (3,4-3,9 em HL); nadadeira peitoral curta, quando deprimidos a sua ponta não atinge a vertical através do ânus; segundo espinho da nadadeira anal longo (1,8-2,5 em HL); metade inferior dos raios moles da nadadeira dorsal coberto por escamas (geralmente 1-5 séries longitudinais), segunda nadadeira dorsal com 32-38 (geralmente 34) raios moles; 18-23 rastros no primeiro arco branquial (Casatti, 2005).



**Figura 4.** Espécime de *P. auratus*. (Foto: Douglas Pereira)

A pescada preta ocorre no rio Orinoco, rios das Guianas e na bacia Amazônica (Figura 5). Ocupa os mesmos biótopos que *P. squamosissimus*, mas é menos abundante que esta (Boujard *et al.*, 1997). A alimentação de *P. auratus* é similar à de *P. squamosissimus*, onde os juvenis se alimentam de larvas de insetos e crustáceos enquanto que adultos alimentam-se principalmente de peixes (Froese e Pauly, 2010).

Os dados econômicos sobre *P. auratus* são escassos, e apesar de não existirem dados de produção de pescada preta sabe-se que a mesma é explorada para fins comerciais nos mercados do baixo e médio Amazonas, apesar de ser menos comum que *P. squamosissimus* (Ferreira *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Distribuição de *P. auratus*. Os círculos pretos correspondem aos locais de ocorrência da espécie. (Fonte: Casatti, 2005)

### 1.1.5 O DNA mitocondrial e o uso da região controle em estudos moleculares de peixes

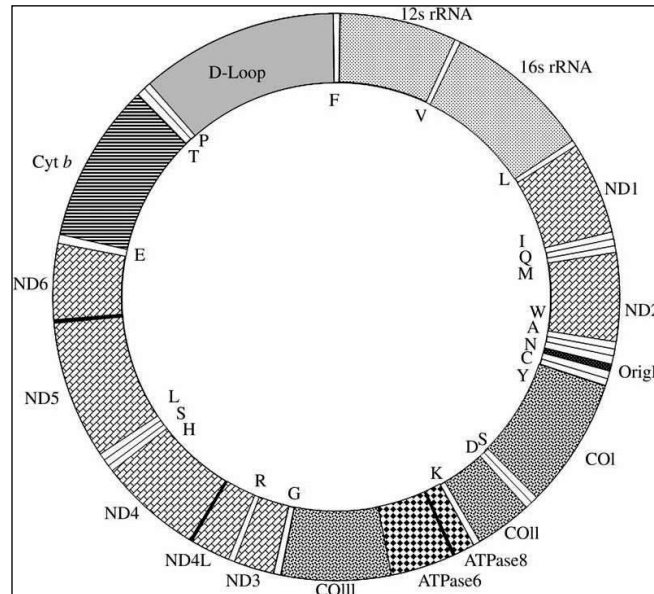
A mitocôndria é uma organela celular que possui uma pequena molécula de DNA que é matematicamente herdada na maioria das espécies (Frankham *et al.* 2008).

Nos vertebrados, este genoma (Figura 6) possui uma única região não codificadora (região controle) responsável pela sua replicação, 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes para RNA transportadores e dois genes codificadores de RNA ribossomal (rRNA 12S e rRNA16S) (Snustad e Simmons, 2008).

O DNA mitocondrial dos vertebrados possui padrão de herança estritamente materno, e diversas evidências de evolução neutra, associada à alta taxa de mutação desta molécula, tem ajudado a torná-la uma das mais utilizadas para estudos de genética evolucionária, populacional, filogeografia e análises filogenéticas (Brown, 2008). Por outro lado é importante considerar que estudos demonstram que esta molécula pode estar sobre forte seleção e os resultados das análises baseadas apenas em marcadores mitocondriais devem considerar estes fatores (Ballard e Rand, 2005).

A região controle do DNAmt recebe este nome porque é a responsável pelo controle da replicação das fitas leve e pesada do DNA mitocondrial. É a única região não codificadora do genoma mitocondrial, e em decorrência disso sofre menor pressão seletiva que o restante da molécula, resultando em altas taxas mutacionais. A alta variabilidade observada nesta região a

tem tornado muito eficiente para revelar diferenciação e avaliar a variabilidade genética e filogeografia em peixes (Avise, 2009; Brown, 2008).



**Figura 6.** Genoma mitocondrial de vertebrados. (Fonte: Brown, 2008)

Santos *et al.* (2007) analisaram sequências da região controle de cinco populações de *Colossoma macropomum* ao longo da bacia amazônica, observando alta variabilidade genética e intenso fluxo gênico nas populações, o que levou os autores a sugerir que os tambaquis amostrados formam uma população panmítica ao longo da calha principal do rio Amazonas.

Rodrigues *et al.* (2008) utilizaram a região controle para determinar a variabilidade genética do cianídeo *Cynoscyon acoupa* na costa Norte do Brasil (Amapá e Pará) e encontraram baixos níveis de diversidade genética, além de ausência de estruturação populacional, indicando a presença de um único estoque na área amostrada.

Gomes *et al.* (2008) investigaram o grau de similaridade e estruturação genética de populações de pargo vermelho *Lutjanus purpureus* da costa Norte do Brasil (Amapá, Pará e Maranhão) e *L. campechanus* da costa atlântica dos Estados Unidos (Flórida, Louisiana e Mississippi), através da região controle do DNAm. Os resultados mostraram alta similaridade entre *L. campechanus* e *L. purpureus*, e ausência de estruturação genética entre as populações compatível com a hipótese de uma única espécie de pargo vermelho para o Oceano Atlântico ocidental.

Soares (2008) utilizou a região controle para avaliar a estrutura genética de *P. squamosissimus* das localidades de Aveiro, Alenquer, Santarém e Monte Alegre no oeste do

Pará, e detectou a presença de uma grande população panmítica no médio Amazonas que é geneticamente diferenciada da uma população de Aveiro, do rio Tapajós.

Galletti (2009) também utilizou a região controle do DNAmT para avaliar a variabilidade genética da pescada branca *P. squamosissimus*, nas localidades de Tabatinga-AM, Tefé-AM, Lago Janauacá (entorno de Manaus-AM), Soure (PA) e Amapá (AP) regiões distribuídas ao longo da calha principal do Rio Amazonas, e evidenciou que não há delimitação de populações geneticamente sub-estruturadas entre as cinco localidades amostradas na calha principal do rio Amazonas em pelo menos uma faixa de aproximadamente 2.300 km de distância.

Viñas *et al.* (2010) utilizaram a região controle do DNAmT para analisar a estrutura populacional de *Xiphias gladius* do Mar Mediterrâneo e revelaram pela primeira vez uma clara diferenciação genética entre populações de espadartes da região leste e oeste naquela área.

### 1.1.6 O DNA nuclear e o uso da região tmo-4c4 em estudos moleculares de peixes

O genoma nuclear exibe grande complexidade e diversos genes têm se mostrado úteis para inferir relações filogenéticas (Friedlander *et al.*, 1992). No presente estudo optou-se pela região Tmo-4C4 do DNA nuclear, a qual recebe essa denominação em alusão ao ciclídeo *Tropheus moorii* de onde ela foi isolada inicialmente (Streelman *et al.*, 1997), e consiste de um gene codificador de proteínas que tem sido amplamente utilizado, em conjunto com outros marcadores, para propor inferências filogenéticas entre gêneros e famílias de peixes (Streelman *et al.*, 2002; Rüber *et al.*, 2004; Westneat e Alfaro, 2005; Byrkjedal *et al.*, 2007; Viñas *et al.*, 2010).

Rüber *et al.* (2004) utilizaram os marcadores nuclear Tmo-4C4 e RAG1, juntamente com o marcador mitocondrial Citocromo b (Cit b) para reconstruir as relações filogenéticas entre 13 espécies da família Badidae e avaliar o papel da especiação vicariante na evolução e distribuição atual desta família. Os cladogramas foram bem apoiados por *bootstrap* indicando monofiletismo dos gêneros *Dario* e *Badis*, e confirmando a existência de cinco espécies de *Badis* como sugerido em trabalhos prévios. Os dados de Tmo-4C4 e Cit b associados indicaram um papel importante de eventos vicariantes moldando os padrões atuais de distribuição da família Badidae.

Byrkjedal *et al.* (2007) reavaliaram o *status* taxonômico de *Eumicrotremus spinosus* e *E. eggvinii* utilizando caracteres merísticos, morfométricos, sequências de DNA mitocondrial

(COI, COII e Cit b) e nuclear (Tmo-4C4) de 83 espécimes, sendo 67 de *E. spinosus* e 16 de *E. eggvinii*. As comparações genéticas indicam que, embora morfologicamente os táxons possam ser diferenciados em um número considerável de caracteres, estes são todos da espécie *E. spinosus*, pois são 100% idênticos para COI, COII, Tmo-4C4 e uma única substituição sinônima foi encontrada em Cit b. Com base nestes resultados os autores propuseram que a diferenciação morfológica está associada ao dimorfismo sexual na espécie.

Rocha *et al.* (2008) utilizaram os marcadores nucleares (Tmo-4C4 e RAG2) e os mitocondriais (Cit b e COI) para testar hipóteses de especiação e diversificação no Caribe, e elucidar as relações filogenéticas entre 19 espécies nominais de *Haemulon*, que ocorrem no oeste do Atlântico e leste do Pacífico e *Inermia vittata* (família Inermiidae). As análises genéticas refutam a estreita relação entre *H. aurolineatum*, *H. boschmae* e *H. striatum* a qual foi sugerida com base em análises morfológicas. Por outro lado, os resultados confirmam que *H. plumieri* e *H. sciurus* são grupos irmãos, corroborando o que já havia sido proposto com base em morfologia. Os dados também sugerem que populações de *H. steindarchneri* de ocorrência no Atlântico e no Pacífico, sejam consideradas espécies distintas além de proporem a inclusão de *Inermia vittata* no gênero *Haemulon*.

Musilová *et al.* (2009) utilizando dados de oito genes, quatro mitocondriais e quatro nucleares, entre eles o Tmo-4C4, confirmaram o *status* taxonômico de espécie à *Andinoacara stalsbergi* e revelaram as relações de parentesco entre este ciclídeo e seus congêneres. As árvores mostram dois cladogramas para *Andinoacara*: um formado por *A. biseriatus* e *A. sapayensis*, *A. rivularis* e *A. stalsbergi* e outro consistindo de três espécies válidas *Andinoacara latifrons*, *A. coeruleopunctatus*, *A. pulcher* e outras ainda não descritas *A. cf. pulcher* “Venezuela”, *A. cf. pulcher* “Rio Chirgua”, *A. sp.* “Orinoco” e *A. sp.* “Maracaibo”. *Andinoacara stalsbergi* mostrou-se mais proximamente relacionada à *A. rivulatus*.

Viñas *et al.* (2010) reconstruíram as relações filogenéticas de quatro espécies do gênero *Sarda* (*S. sarda*, *S. orientalis*, *S. australis* e *S. chiliensis*) utilizando análises de sequências obtidas da região Tmo-4C4 e da região controle do DNAm. Os cladogramas obtidos a partir destes marcadores foram concordantes e apoiaram fortemente a monofilia para *Sarda* corroborando resultados indicados por dados morfológicos para o gênero.

### 1.1.7 Justificativa

Estudos para conhecer o *status* taxonômico e o grau de estruturação genética de populações de *P. auratus* e *P. squamosissimus* são fundamentais para determinação de que estoques podem ser manejados em conjunto ou isoladamente (Frankham *et al.*, 2008).

Situações onde ocorre redução ou ausência de divergência genética entre espécies congêneres podem ser artefatos gerados por erros de identificação. Por outro lado a total similaridade genética entre espécies reconhecidas morfológicamente como válidas pode ser devido à ocorrência de retenção de polimorfismo ancestral ou hibridização ou introgressão do DNA mitocondrial (Hebert *et al.*, 2003).

Considerando a total similaridade genética entre *P. squamosissimus* e *P. auratus* ao nível da COI do DNAm<sub>t</sub> e gene Tmo-4C4 do DNA nuclear (Cunha, 2007; Ferreira, 2008), e considerando que ambas ocorrem em simpatria em seu habitat natural, torna-se necessário um estudo genético detalhado destes táxons para averiguar se tratam-se de indivíduos da mesma espécie com diferentes adaptações morfológicas ao ambiente em que vivem, ou se eventos de hibridização, introgressão do DNA mitocondrial ou retenção de polimorfismo ancestral está ocorrendo nestas espécies. Também com este tipo de investigação será possível confirmar ou refutar a hipótese de erro de identificação dos espécimes avaliados por Cunha (2007) e Ferreira (2008).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o grau de diferenciação genética entre as populações de *P. squamosissimus* e *P. auratus*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o grau de sub-estruturação genética entre as populações de *P. squamosissimus* e *P. auratus* na área amostrada;
- b) Avaliar os níveis de diversidade genética de *P. squamosissimus* e *P. auratus*;
- c) Comparar os graus de divergência genética dentro das populações e entre as espécies *P. squamosissimus* e *P. auratus*;

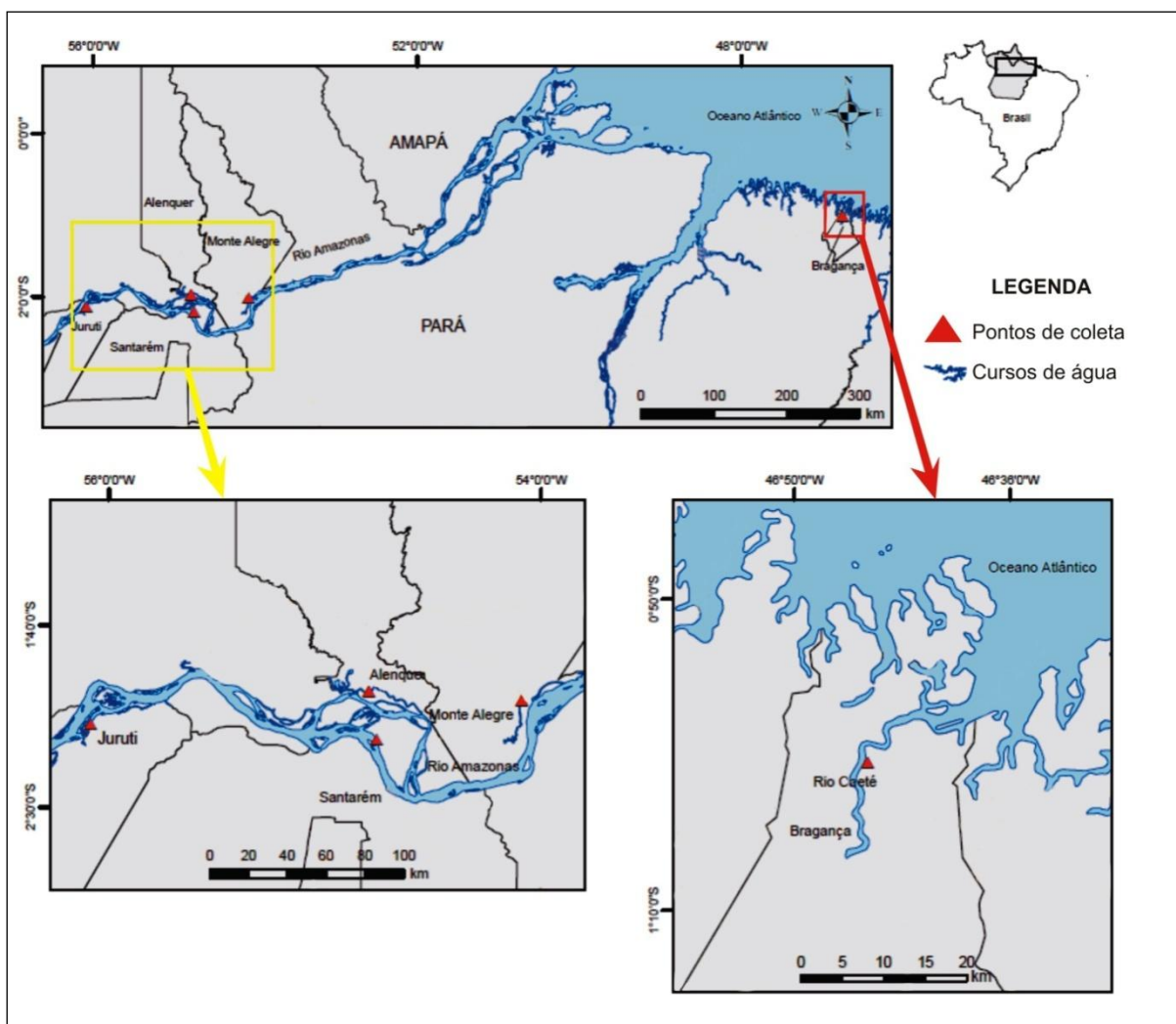
- d) Realizar inferências sobre a história demográfica das espécies analisadas;
- e) Fornecer subsídios para futuros planos de manejo.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAGEM

Foram amostrados 199 exemplares, sendo 108 de *P. squamosissimus* e 91 de *P. auratus* nos municípios paraenses de Santarém, Alenquer, Juruti, Monte Alegre e Bragança. Os locais onde cada espécie foi amostrada estão ilustrados na figura 7 e o número amostral de cada coleta está descrito na tabela 1.



**Figura 7.** Mapa mostrando os pontos de coletas de *P. squamosissimus* e *P. auratus*.  
(Fonte: IBGE, 2011; software utilizado ArcGIS)

**Tabela 1.** Locais de coleta e número amostral de *Plagioscion squamosissimus* e *P. auratus*.

| Local de Coleta | Coordenadas geográficas     | Número Amostral          |                   |
|-----------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------|
|                 |                             | <i>P. squamosissimus</i> | <i>P. auratus</i> |
| Santarém        | 02°11'27.0"S e 54°45'45.5"W | 28                       | 35                |
| Alenquer        | 01°58'12.0"S e 54°47'45.9"W | 28                       | 25                |
| Juruti          | 02°07'23.9"S e 56°05'13.7"W | 29                       | -                 |
| Monte Alegre    | 02°00'34.2"S e 54°05'13.7"W | 23                       | -                 |
| Bragança        | 01°00'28,8"S e 46°45'14.7"W | -                        | 31                |
| <b>Total</b>    |                             | 108                      | 91                |

Para se ter certeza de que os indivíduos coletados eram da área de amostragem, as coletas foram realizadas *in loco* através da pesca artesanal utilizando rede de emalhar. Os espécimes de Bragança foram cedidos pela Dra. Simôni Santos e foram obtidas no mercado municipal de Bragança. Todos os exemplares foram medidos utilizando paquímetro de precisão, identificados com literatura especializada (Casatti, 2005) e etiquetados. De cada indivíduo se retirou tecido muscular da região dorsal que foi acondicionado em etanol (70%) até o momento da extração de DNA. Os peixes fixados em formol a 10%, depois transferidos para recipientes com etanol a 70% e estão em processo de doação para a coleção ictiológica do Museu de Zoologia da UFOPA- Santarém- PA, exceto as amostras de Bragança, as quais foram armazenados no laboratório de genética e biologia molecular do Instituto de Estudos Costeiros da UFPA, Campus Bragança- PA.

## 2.2 EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES GENÔMICAS

Os processos de extração de DNA, amplificação e sequenciamento das regiões genômicas utilizadas para este trabalho foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Estudos Costeiros da UFPA, Campus Bragança- PA.

O DNA genômico foi isolado do tecido muscular utilizando o protocolo padrão com fenol/clorofórmio e digestão por proteinase K, seguido por precipitação em acetato de sódio e isopropanol, modificado a partir de Sambrook *et al.* (1989). Após a extração foi feita a eluição do DNA em água bidestilada estéril. A qualidade do DNA extraído foi avaliada, após eletroforese submarina, em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, em um transiluminador de luz ultravioleta.

A amplificação da região controle do DNAm<sub>t</sub> e da região nuclear Tmo-4C4 foram realizados através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores L1: 5' CCTAACTCCCAAAGCTAGGTATTC 3' e H1: 5'

TGTTTATCACTGCTGRRTTCCCT 3' (Santa- Brígida *et al.*, 2007) para isolamento da região controle do DNAmT e Tmo4C4-F2: 5' CGGCCTTCCTAAAACCTCTCATTAAG 3' e Tmo4C4-R2: 5' GTGCTCCTGGGTGACAAAGTCTACAG 3'(Farias *et al.*, 2000) para isolamento da região TMO-4C4.

As reações foram realizadas em um volume total de 25 µL, contendo 4 µL de DNTP (1,25mM), 2,5 µL de tampão (10x), 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25 µL de cada iniciador (200 ng/µl), 1-1,5 µL de DNA total, 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e água purificada para completar o volume final. A amplificação das regiões genômicas foi realizada em condições de ciclagem similares, mudando apenas a temperatura de hibridização como descrito a seguir: uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 47°C (para a região controle) e 50°C (para o Tmo-4C4) por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e ao final dos ciclos uma extensão a 72°C por 7 minutos.

As reações positivas da PCR foram submetidas ao sequenciamento pelo método di-desoxi terminal com o kit BigDye<sup>®</sup> terminator v3.1 cycle sequencing e eletroforeses no sequenciador ABI 3500XL (Applied Biosystems).

### 2.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E POPULACIONAIS

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas no programa Bioedit (Hall, 1999) e foram criados bancos de dados no formato de entrada dos programas de análises genéticas.

No programa DAMBE (Xia e Xie, 2001) os bancos de dados foram submetidos ao teste de saturação das transições e transversões em relação à distância genética. No DNAsp 5.0 (Librado e Rozas, 2009) foram selecionados os haplótipos de cada espécie e gerados os bancos de dados para as análises no Arlequin 3.11 (Excoffier e Schneider, 2005) e Network 4.5.1.0 (Fluxus technology, 2004-2009. [www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm](http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm)). O MODELTEST 3.06 (Posada e Crandall, 1998) selecionou o modelo de evolução mais adequado para as análises de máxima verossimilhança e para a verificação das taxas de divergência genética entre os haplótipos de *P. squamosissimus* e *P. auratus*.

No programa PhyML (Guindon e Gascuel, 2003) foram gerados cladogramas pelo método de máxima verossimilhança e o grupo externo utilizado para o cladograma da região controle foi o *Cynoscion acoupa* retirado do genbank (número de acesso: EU562598) enquanto que para o cladograma da região Tmo-4C4 foram utilizados como grupos externos as espécies *Cynoscion acoupa*, *Macrodon ancylodon*, *Isopisthus parvipinnis* e *Pachyurus* sp.,

obtidos do banco de sequências de Simôni Santos (Comunicação pessoal). O suporte estatístico dos agrupamentos na árvore foi gerado através de 1.000 pseudoréplicas de *bootstrap*.

Para verificar a distribuição espacial dos haplótipos em todas as populações foi construída uma rede de haplótipos através do método de vetores medianos no programa Network 4.5.1.0 (Fluxus technology, 2004-2009. [www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm](http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm)).

Para as demais análises populacionais foi utilizado o programa Arlequin 3.11 (Excoffier e Schneider, 2005). A diversidade genética das populações foi estimada utilizando-se os índices de diversidades haplotípica ( $h$  - medida que considera a frequência e número de haplótipos entre os indivíduos) e nucleotídica ( $\pi$  - estimativa corrigida de divergência entre as sequências).

A diferenciação genética entre os pares de populações foi avaliada utilizando-se o índice de fixação ( $F_{ST}$ ), e a significância dos valores gerados foi obtida através de 10.000 permutações randômicas. A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para verificar o particionamento da variação genética dentro e entre as populações de *P. squamosissimus* e *P. auratus*.

O teste de Mantel (Mantel, 1967) foi realizado no Programa Genetix, versão 4.2 (Belkhir, 2001) para verificar se havia associação significativa entre a distância genética e a distância geográfica entre as populações. Para realização do teste foi construída uma matriz com dados de distância genética e distância geográfica. A matriz de distância genética utilizada foi aquela de  $F_{ST}$  gerada no programa Arlequin, enquanto que a matriz de distância geográfica foi construída transformando as coordenadas geográficas entre todos os pontos de amostragem em Km, onde a distância entre um ponto e outro foi obtida em linha reta. Essa conversão foi realizada com auxílio do programa Google earth ([www.earth.google.com.br](http://www.earth.google.com.br)).

Foram realizados os testes de neutralidade seletiva  $F_s$  (Fu, 1997) e  $D$  (Tajima, 1989) para verificar se havia desvios da neutralidade nas populações avaliadas bem como para fazer inferências sobre a história demográfica das mesmas. A história demográfica das populações de *P. squamosissimus* e *P. auratus* foi avaliada utilizando-se o teste de distribuição das diferenças genéticas par-a-par entre os pares de haplótipos de acordo com o modelo de expansão súbita (*Mismatch distributions*) proposto por Rogers e Harpending (1992). Este método pode discriminar se uma população passou por uma rápida expansão ou se permaneceu estável ao longo do tempo.

O índice de raggedness de Harpending (Harpending, 1994) e a soma dos desvios quadrados (SSD) entre a distribuição *mismatch* observada e esperada foram calculados como

testes estatísticos para validar o modelo de expansão estimado. A significância do teste SSD foi obtida por *bootstrap* paramétrico o qual estima a probabilidade de observar uma menor adequação entre o modelo de expansão e a distribuição ao acaso. Neste teste se 95% ou mais da distribuição *mismatch* simulada mostrar melhor adequação que a observada o modelo de expansão será rejeitado.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E DE DIVERGÊNCIA NUCLEOTÍDICA

Foram obtidos 644 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial de 108 indivíduos de *P. squamosissimus* e de 91 indivíduos de *P. auratus* de cinco localidades do estado do Pará (Tabela 1). Um total de 73 haplótipos foram verificados para região controle do DNAm, 42 para *P. squamosissimus* e 31 para *P. auratus* (Tabelas 2 e 3).

Foram selecionados os haplótipos divergentes de cada população e um total de 432 pares de base da região nuclear Tmo-4C4 foi sequenciado em 40 indivíduos de *P. squamosissimus* e 30 de *P. auratus* resultando em três haplótipos, sendo 2 para *P. squamosissimus* e 1 para *P. auratus*.

A divergência nucleotídica entre *P. squamosissimus* e *P. auratus* foi em média 14,4%, com máxima de 16,7% (entre os indivíduos PauStm13 e PsqMon26) e mínima de 13,2% (para os indivíduos PauAlq28 e PsqJur33). A divergência genética para as populações de *P. squamosissimus* foi em média de 1% com máxima de 2,4% (entre os indivíduos PsqJur29 e PsqAlq29), e mínima de zero entre indivíduos da mesma população e de populações distintas. Entre as populações de *P. auratus* as divergências médias, máximas e mínimas foram de 1,4%, 4% (entre PauAlq14 e PauStm13) e zero respectivamente.

O MODELTEST selecionou o modelo Kimura 2 parâmetros (K2P; Kimura,1980) como o mais adequado para a reconstrução filogenética baseado na região controle, onde apenas um indivíduo representante de cada haplótipo foi utilizado. O resultado da árvore filogenética de máxima verossimilhança, para esta região genômica, mostra dois clados reciprocamente monofiléticos, separando os táxons de *P. squamosissimus* e de *P. auratus*, sendo cada clado fortemente apoiado por suporte estatístico (Figura 8).

Na árvore de máxima verossimilhança da região nuclear Tmo-4C4 também foi utilizado o modelo K2P (Kimura, 1980), selecionado pelo MOLDETTEST. Uma vez que apenas três haplótipos foram obtidos com este marcador, dois para *P. squamosissimus* e um para *P. auratus*, na árvore foram incluídos três indivíduos de cada local amostrado. Como na árvore do DNA mitocondrial, o cladograma separou dois grupos reciprocamente monofiléticos, um contendo *P. squamosissimus* e outro com *P. auratus* com elevado suporte estatístico (Figura 9).

**Tabela 2.** Sítios variáveis da região controle do DNAm de *P. squamosissimus*.

| HAPLÓTIPOS | SÍTIOS VARIÁVEIS   | N  | LOCAL   |
|------------|--|----|---|
|            | 247891111111112222223333455555555555555<br>22340001223455600044794446100223345567788<br>015451757612336880787156376751913634 |    |   |
| H1         | ACAAAACCTTGCCCGAGATCTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 4  | Santarém(2),Alenquer(2)                       |
| H2         | ACAAAACCTCGCCCGAGATCTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 17 | Santarém(5),Alenquer(7),M.Alegre(1),Juruti(3) |
| H3         | ACAAAACCCCGCCCGAGGTCTGGATCTCATTTCGATGCTT   | 1  | Santarém(1)                                   |
| H4         | ACAAAATCCACCCGAAGTCTGGATCCTGCTGTTGGTGCTT   | 13 | Santarém(7),Alenquer(3),M.Alegre(3)           |
| H5         | ACAAAACCTCGCCCGAAATCTGGATCTTGCTTTTGGTGCTT  | 2  | Santarém(1),Alenquer(1)                       |
| H6         | ACAAAACCCCGCCCGAGGTCTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 1  | Santarém(1)                                   |
| H7         | ACAAAACCCCGTCCGAGGTCTGGATCTTATCTTGCTTGCTT  | 12 | Santarém(1),Alenquer(4),M.Alegre(5),Juruti(2) |
| H8         | ACAAAATCTCGCCCGAGATCTGGATTTTGCTCTTGGTGCTT  | 1  | Santarém(1)                                   |
| H9         | ACAAAACCCCGCCCGAGATCTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 3  | Santarém(2),Juruti(1)                         |
| H10        | ACAAAACCTCGCCCGAGATCTGGATTTTGCTCTTGGTGCTT  | 5  | Santarém(4),Monte Alegre(1)                   |
| H11        | ACAAAACCTCGCCCGAGATTTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 1  | Santarém(1)                                   |
| H12        | ACAAAACCCACCCGAAGTCTGGATCCTGCCGTTGGCGCTT   | 1  | Santarém(1)                                   |
| H13        | ACAAAACCTTGCCCGAGATTTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 1  | Santarém(1)                                   |
| H14        | ACAAAACCTCGCCCGAAATCTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 1  | Alenquer(1)                                   |
| H15        | ACAAAACCTCGCCCGAGATCTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 1  | Alenquer(1)                                   |
| H16        | ACAAAGCCTCGCCCGAGATCTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 2  | Alenquer(2)                                   |
| H17        | ACAAAACCCCGTCCGAGGCCTGGATCTTATCTTGCTTGCTT  | 1  | Alenquer(1)                                   |
| H18        | ACAAAACCCCGTCCGAGGTCTGGGTCTTATCTTGCTTGCTT  | 2  | Alenquer(2)                                   |
| H19        | ACAAAACCCCGTCCGAGGTCTGGATCTTATCTCGGTGCTT   | 3  | Alenquer(1),Monte Alegre(2)                   |
| H20        | ACAAAACCTTGCCCGAGATCTGGATTTTGCTCTTGGTGCTT  | 1  | Alenquer(1)                                   |
| H21        | ACAAAATCCACCCGAAGTCTGGATCCTGCTGTTGGCGCCT   | 3  | Alenquer(1),Monte Alegre(2)                   |
| H22        | ACAAAACCCACCCGAAATCTGGATCCTGCCGTTGGCGCTT   | 1  | Alenquer(1)                                   |
| H23        | ACAAAACCTCGTCCGAGATCTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 2  | Monte Alegre(2)                               |
| H24        | ACAAAACCTCGCCCGAGATCTGGATCTTATCTTGCTTGCTT  | 2  | Monte Alegre(2)                               |
| H25        | ACGAAACCCCGTCCGAGGTCTGGATCTTATTTTGGTGCTT   | 1  | Monte Alegre(1)                               |
| H26        | ACAAAACCCACCCGAAGTCTGGACCCTGCTGTTGGTGCTC   | 1  | Monte Alegre(1)                               |
| H27        | ACAAAACCTCGCCCGAGATCTGGATCTTGCTCTTAGTGCTT  | 1  | Monte Alegre(1)                               |
| H28        | CCAAAACCTCGCCCGAGATCTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 1  | Monte Alegre(1)                               |
| H29        | ACAAAACCTCGTCCGAGATCTGGATCTTGCTCTTGGTGTTT  | 1  | Monte Alegre(1)                               |
| H30        | ACAAAACCCCGCCCGAAATTTGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 2  | Monte Alegre(2)                               |
| H31        | ATAAAACCTCGCCCGAGATCTGGATCTTGCTCTTAGTGCTT  | 2  | Monte Alegre(2)                               |
| H32        | ACAAAACCCGTCTGAGGTCTAGATCTTATCTCGGTACTT  | 2  | Monte Alegre(2)                               |
| H33        | ACAAAACCCGTCCGAGATCTGGATCTTATCTTGCTTGCTT   | 2  | Juruti(2)                                     |
| H34        | ACA-AATCCACCCGAAGTCTGGATCCTGCTGTTAGTGCTT   | 2  | Juruti(2)                                     |
| H35        | ACAAGACCTCGCCCAAGATCCGATCTTGCTTCTGGTGCTT   | 1  | Juruti(1)                                     |
| H36        | ACAAAACCCCGCCCGAGGTCTGGATCTCATTCTCGATGCTT  | 3  | Juruti(3)                                     |
| H37        | ACAAAACCTCGCCCGAGATTTGGATTTTGCTTTTGGTGCTT  | 3  | Juruti(3)                                     |
| H38        | ACAAAACCCCGCCCGAGGTCTGGATCCCATTCTCGATGCTT  | 1  | Juruti(1)                                     |
| H39        | ATAAAACCTCGCCCGAGATCTGGATCTTGCTTTTGGTGCTT  | 1  | Juruti(1)                                     |
| H40        | ATAAAACCCCGCTCGGGGTCTGGATCTCATTCTCGATGCTT  | 1  | Juruti(1)                                     |
| H41        | ACAAAACCTCGCCCGAGATATGGATCTTGCTCTTGGTGCTT  | 1  | Juruti(1)                                     |
| H42        | ?CAAAAACCCCGCCCGAGGTCTGAATCTCATTCTCGATGCTT   | 1  | Juruti(1)                                     |

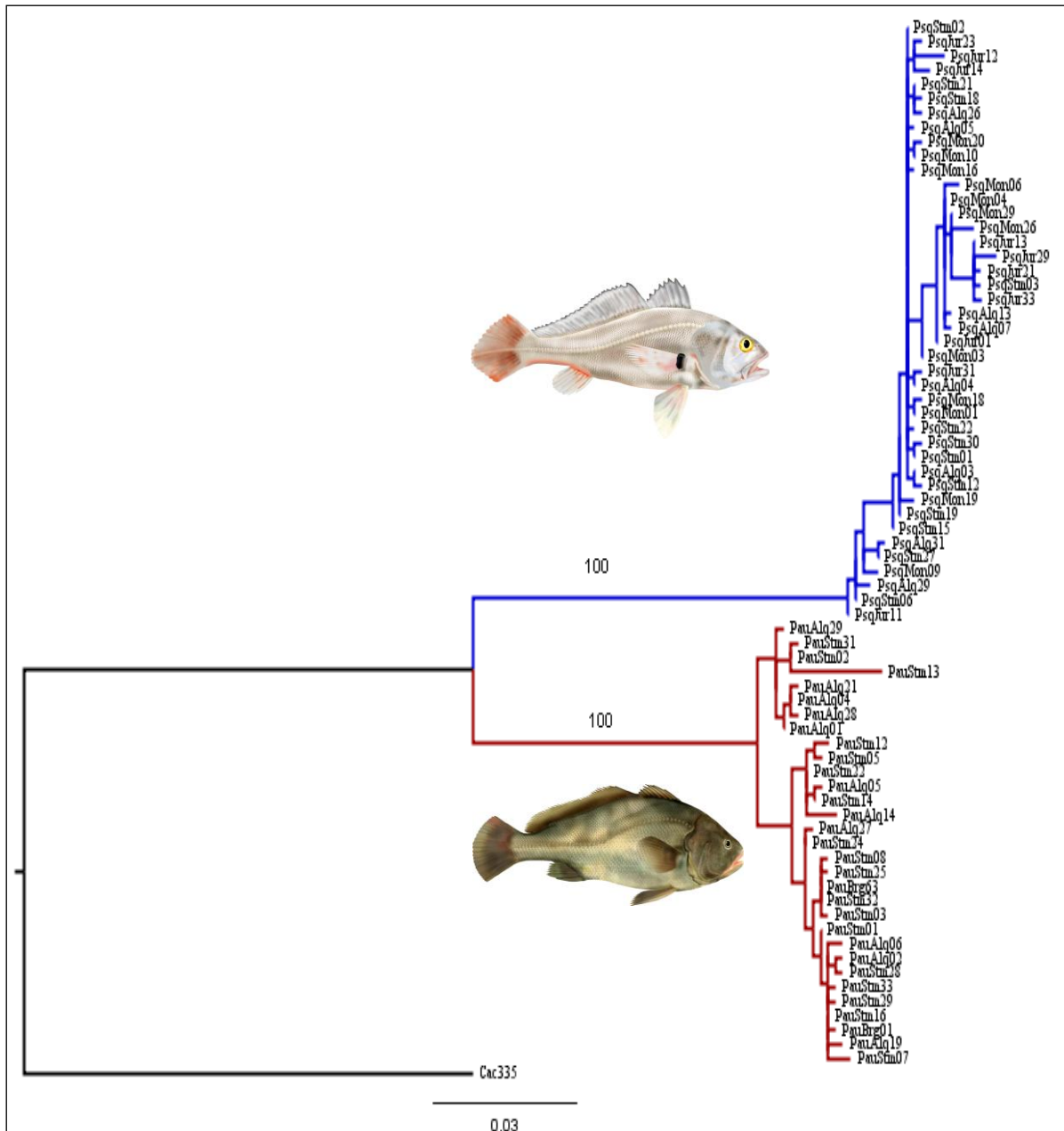
**Síglas:** N- número de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo.

**Tabela 3.** Sítios variáveis da região controle do DNAm para *P. auratus*.

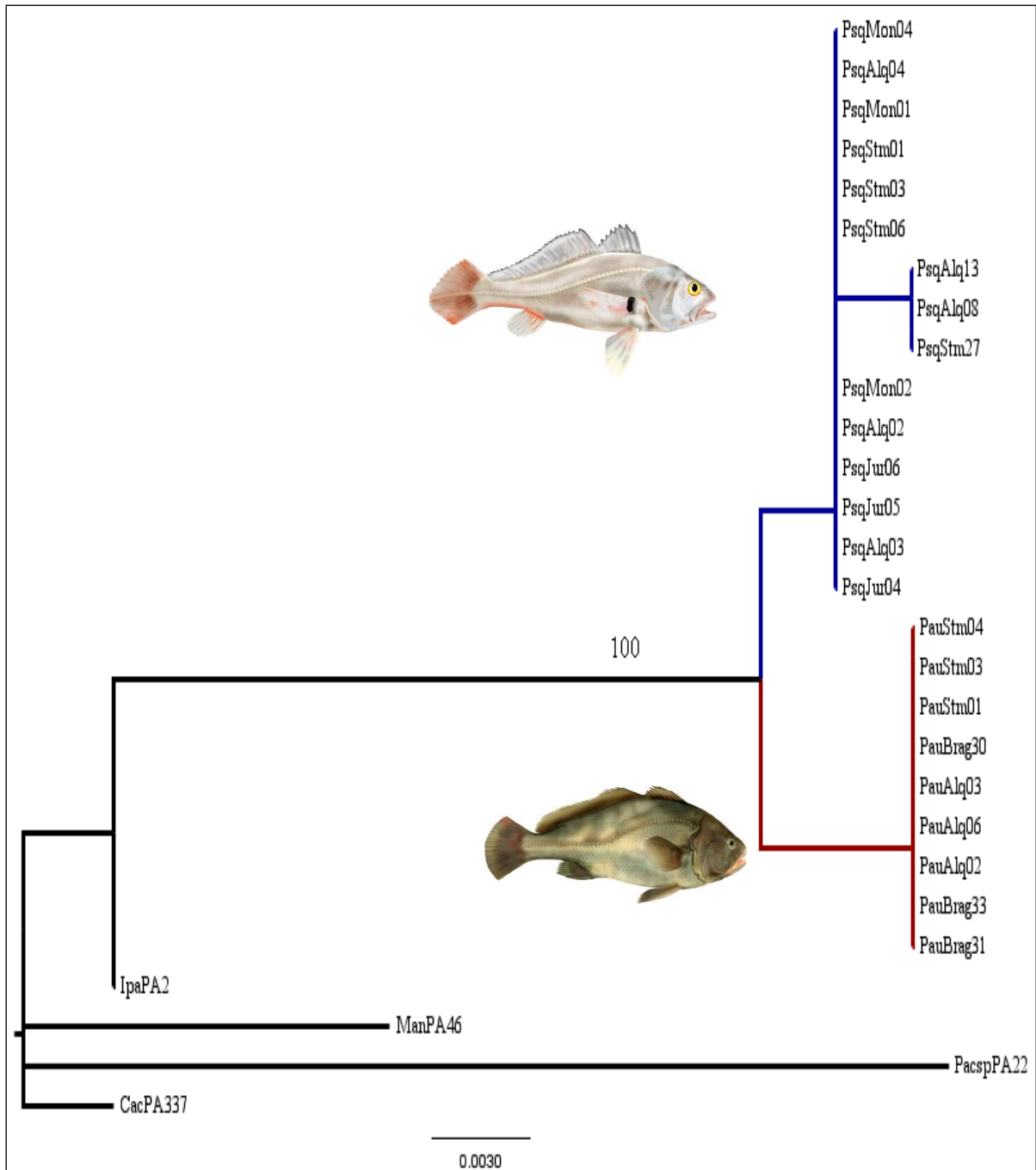
| HAPLÓTIPOS | SÍTIOS VARIÁVEIS<br>9124588891111111111111111122222222223333334455555<br>419978980112333555667990225678992467993501358<br>5246089123136129357444060613562008798 | N  | LOCAL                               |
|------------|---|----|-------------------------------------|
| H1         | AAATGACAAACCTCGAGCTTTTCCTACTTGTTCGTTTGATTACT  | 4  | Santarém(4)                         |
| H2         | AAGTA-TGGATCTCAAGTCTCTCCCTACTTGTTCGTTTGACTTACT  | 3  | Santarém(2),Alenquer(1)             |
| H3         | AAATGACAAACCCCGAGCTTTTCCTACTTGTTCGTTTGATTACT  | 6  | Santarém(5),Alenquer(1)             |
| H4         | AGATAATAAACTCAAGCTTTCCCTACTTGTTCGTTTGATCTACT  | 2  | Santarém(2)                         |
| H5         | AAATGACAAACCTCGAGCTTTTCCTGCTTGTTCGCTTGATTAACC   | 1  | Santarém(2)                         |
| H6         | AAATGACAAACCCCGAGCTTTTCCTACTTATTCGTTTGATTACT  | 1  | Santarém(1)                         |
| H7         | AAATGACAAACCCCGAGCTTTTCCTACTTGTTCGTTTGATTACT  | 3  | Santarém(1),Alenquer(1),Bragança(1) |
| H8         | AAATGATAAACTCAAGCTTTCCCTACTTGTTCATTTGATCTACT  | 1  | Santarém(1)                         |
| H9         | AAGTAACAGATCTCAAGTCGCTCCCGAGGGGGGGTTGGACTTCCT   | 1  | Santarém(1)                         |
| H10        | AAATAACAAAACCTCGAGCTTTCCCTACTTGTTCGTTTGATCTACT  | 1  | Santarém(1)                         |
| H11        | AAATGACAAACTTCGAGCTTTTCCTGCTTGTTCGTTTGATTACC  | 4  | Santarém(1),Alenquer(3)             |
| H12        | AAATGACAAACCTCGAGCTTTTCCTACTTGTTCGTTTGATTACC  | 4  | Santarém(2),Alenquer(2)             |
| H13        | AAATAACAAACCTCGAGCTTTTCCTACTTGTTCGTTTGATTACC  | 32 | Santarém(2),Bragança(30)            |
| H14        | AAATAATAAACTCGAGCTTTCCCTACTTGTTCGTTTGATCTACT  | 1  | Santarém(1)                         |
| H15        | AAATAATGGGTCTCAAGCCTCTCCCTACTTGTTCGTTTGACTTACT  | 5  | Santarém(2),Alenquer(3)             |
| H16        | AAATAACAAACCTCGAGCTTTTCCTACTTGTTCGTTTGATTACT  | 1  | Santarém(1)                         |
| H17        | AAATGACAAGCCCGAGCTTTTCCTACTTGTTCGTTTGATTACT   | 1  | Santarém(1)                         |
| H18        | AAATGACAAACCTCGAGCTTTTCTACTTGTTCGCTGATTACC  | 1  | Santarém(1)                         |
| H19        | AAATGACAAACCTCGAGCTTTTTTCTACTTGTTCGTTTGATTACC   | 1  | Santarém(1)                         |
| H20        | AAATAATGGGTCTCAAGCCTCTCCCTACTTGTTCGTTTGACTTATT  | 3  | Santarém(1), Alenquer(2)            |
| H21        | AAGTA-TGGATCTCAAGTCTCTCCCTACTTGTTCATTTGACTTACT  | 1  | Santarém(1)                         |
| H22        | ---TGACAAACCCCGAGCTTTTCCTACTTGTTCGTTTGATTACT  | 1  | Santarém(1)                         |
| H23        | AAATGACAAACCTCAAGCTTTTCCTACTTGTTCGTTTGATTACC  | 2  | Santarém(2)                         |
| H24        | AAATGACAAACCTCGAAGCTTTTCCTACTTGTTCGCTGATTACC  | 2  | Alenquer(2)                         |
| H25        | GAATAACAAAACCTCGAGCTTTCCCTACTTGTTCGTTTGATCTACT  | 1  | Alenquer(1)                         |
| H26        | AAACGATAAACTCGGGCTTTCCCTACTTGTTCGCTGATCTACT   | 1  | Alenquer(1)                         |
| H27        | AAATGACAAATCTCGAGCTTTTCCTACTTGTTCATTTGATTACC  | 2  | Alenquer(2)                         |
| H28        | AAATAATGGGTCTCAAGCCTCTCCCTACTTGTTCGTTTACTTATT   | 1  | Alenquer(1)                         |
| H29        | AAATAACAAACCTCGAGCTTTTCCTACTTGTTCGTTTGATTATT  | 1  | Alenquer(1)                         |
| H30        | AAATAATGGGTCTCAAGCCTCTCCCTACTTGTTCGTTTGGCTTATT  | 1  | Alenquer(1)                         |
| H31        | AAATAATGGATCTTAAGCCTCTCCCTACTTGTTCGTTTGACTTACT  | 2  | Alenquer(2)                         |

**Síglas:** N- número de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo.





**Figura 8.** Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de 644 pb da região controle do DNA mitocondrial de *P. squamosissimus* e *P. auratus* a partir do modelo K2P (Kimura, 1980). O grupo externo é *Cynoscion acoupa* representado na árvore como Cac335 e foi retirado do Genbank (número de acesso: EU562598). Valores acima dos ramos são o suporte estatístico obtidos para 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Siglas: Psq- *Plagioscion squamosissimus*, Pau- *Plagioscion auratus*; Stm- Santarém, Alq- Alenquer, Mon- Monte Alegre, Jur- Juruti e Brg- Bragança.



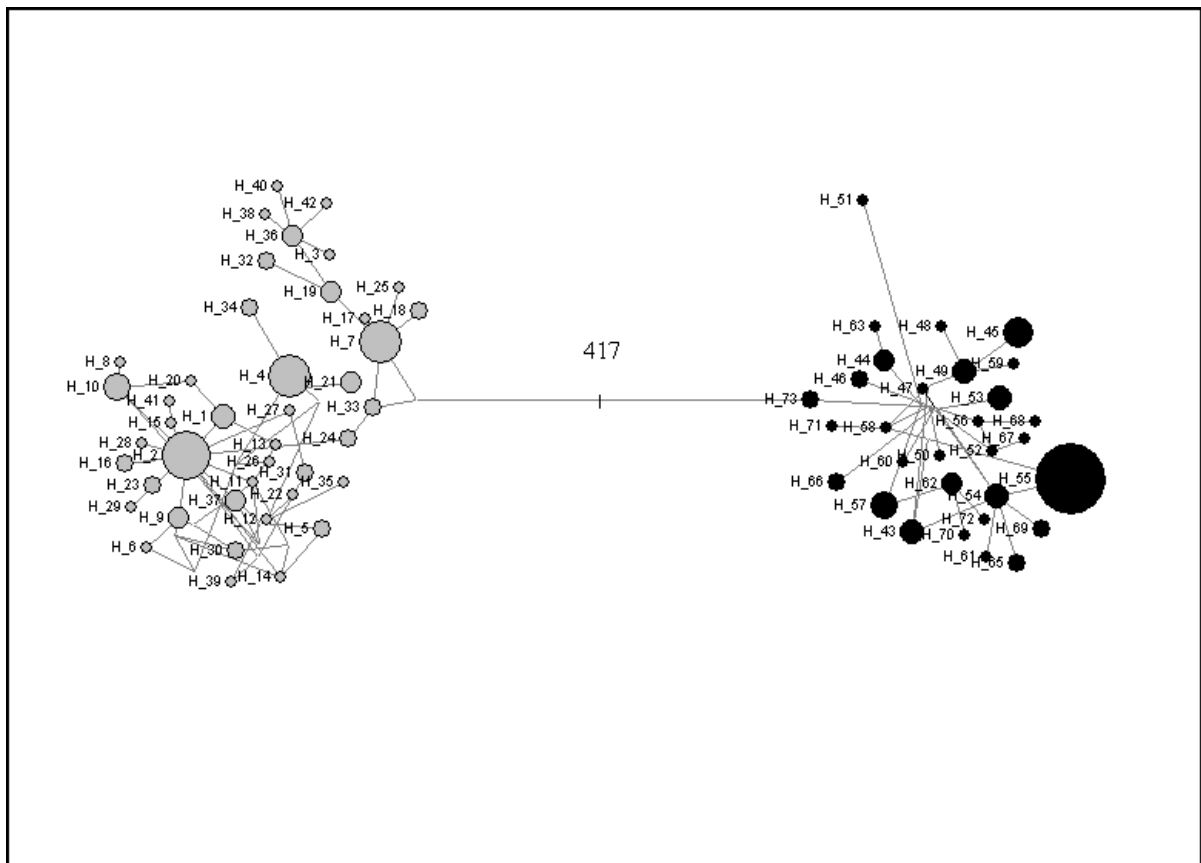
**Figura 9.** Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de 432 pb da região nuclear Tmo-4C4 de *P. squamosissimus* e *P. auratus* a partir do modelo K2P. Grupos externos são *Isopisthus parvipinnis* (IpaPA2), *Macrodon ancylodon* (ManPA46) *Pachyurus* sp. (PacspPA22) e *Cynoscion acoupa* (CacPA337). Acima do ramo está o suporte estatístico para os agrupamentos, este foi obtido com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Siglas: Psq- *Plagioscion squamosissimus*, Pau- *Plagioscion auratus*; Stm- Santarém, Alq- Alenquer, Mon- Monte Alegre, Jur- Juruti e Brg- Bragança.

## 3.2 ANÁLISES POPULACIONAIS

### 3.2.1 Análise interespecífica

Uma vez que a região nuclear mostrou pouca variação para ambas as espécies, as análises populacionais foram realizadas apenas com o DNAm.

A rede de haplótipos evidenciou dois haplogrupos distintos, um constituído somente por haplótipos de *Plagioscion squamosissimus* e outro por *P. auratus*, separados entre si por 417 mutações (Figura 10).



**Figura 10.** Rede de haplótipos baseada nos sítios polimórficos da região controle do DNA mitocondrial de *P. squamosissimus* (círculos cinzas) e *P. auratus* (círculos pretos). Áreas dos círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos, 417 é o número de mutações que separa os haplogrupos das duas espécies.

A AMOVA considerando dois grupos, um com populações de *P. squamosissimus* e outro com populações de *P. auratus*, mostrou que 98,50% da variância nos dados é resultado da diferenciação entre os grupos ( $F_{CT} = 0,9850$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabela 12). Entre as populações dentro dos dois grupos a porcentagem da variação foi de 0,18% ( $F_{SC} = 0,1170$ ;  $P > 0,05$ ) e dentro das populações a porcentagem da variação foi de 1,32% ( $F_{ST} = 0,9867$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) para as populações de *Plagioscion squamosissimus* e *Plagioscion auratus*.

| Fonte de Variação                     | Componentes de Variância | Porcentagem de Variação | F/ $\Phi$ -             | P     |
|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|
| Entre os grupos                       | 203,63052                | 98,50                   | F/ $\Phi_{CT}$ = 0,9850 | <0,01 |
| Entre as populações dentro dos grupos | 0,36212                  | 0,18                    | F/ $\Phi_{SC}$ = 0,1170 | <0,01 |
| Dentro das populações                 | 2,73248                  | 1,32                    | F/ $\Phi_{ST}$ = 0,9867 | <0,01 |
| Total                                 | 206,72512                |                         |                         |       |

Os resultados da diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) entre os pares de populações de *P. squamosissimus* e *P. auratus* variaram de 0,98 a 0,99 e são altamente significativos confirmando a ausência de fluxo gênico mediado por fêmeas entre os dois táxons (Tabela 5).

**Tabela 5.** Índice de fixação ( $F_{ST}$ ) entre os pares de populações de *P. squamosissimus* e *P. auratus*

|         | PsqStm | PsqAlq | PsqMon | PsqJur | PauStm | PauAlq |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Psq Stm |        |        |        |        |        |        |
| PsqAlq  | 0,019  |        |        |        |        |        |
| PsqMon  | 0,068* | -0,002 |        |        |        |        |
| PsqJur  | 0,081* | 0,033  | 0,024  |        |        |        |
| PauStm  | 0,984* | 0,984* | 0,983* | 0,983* |        |        |
| PauAlq  | 0,984* | 0,983* | 0,982* | 0,981* | 0,023  |        |
| PauBrg  | 0,994* | 0,994* | 0,993* | 0,993* | 0,281* | 0,380* |

\* Diferenciação significativa ao nível de 0,05.

**Siglas:** Psq- *Plagioscion squamosissimus*, Pau- *Plagioscion auratus*; Stm- Santarém, Alq-Alenquer, Mon-Monte Alegre, Jur- Juruti, Brg- Bragança.

### 3.2.2 Análises intraespecífica

#### 3.2.2.1 *Plagioscion squamosissimus*

Um total de 644 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial foram sequenciados em 108 indivíduos de *Plagioscion squamosissimus* revelando 41 sítios polimórficos em 42 haplótipos (Tabela 2). A maioria dos haplótipos (52,4%) de *P. squamosissimus* foi único, e apenas três haplótipos foram mais frequentes nas populações (H2, H4 e H7) sendo compartilhados por 17, 13 e 12 indivíduos respectivamente (Tabela 2).

A diversidade haplotípica foi elevada em todas as populações ( $h = 0,90 - 0,95$ ) e a diversidade nucleotídica foi elevada nas localidades de Santarém, Juruti e Monte Alegre ( $\pi = 0,7\% - 1\%$ ), mas baixa na população de Alenquer ( $\pi = 0,4\%$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Índices de diversidade genética e testes de neutralidade para populações de *P. squamosissimus*.

| População    | N   | NH | Diversidade Haplótipica( <i>h</i> ) | Diversidade Nucleotídica( $\pi$ ) |
|--------------|-----|----|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Santarém     | 28  | 13 | 0,897±0,0358                        | 0,007±0,0040                      |
| Alenquer     | 28  | 14 | 0,913±0,0350                        | 0,004±0,0043                      |
| Monte Alegre | 29  | 16 | 0,951±0,0215                        | 0,009±0,0051                      |
| Juruti       | 23  | 13 | 0,941±0,0269                        | 0,010±0,0055                      |
| <b>Total</b> | 108 | 42 |                                     |                                   |

**Siglas:** N - número de amostras sequenciadas; NH - número de haplótipos.

Na rede de haplótipos não há uma estruturação clara entre locais amostrados, uma vez que dois dos três haplótipos mais frequentes (H2 e H7) estão presentes em todas as populações analisadas e apenas Juruti não contém H4 que está presente nas demais áreas amostradas. Os demais haplótipos, embora sejam representados por um ou poucos indivíduos, são proximamente relacionados corroborando a falta de estruturação visível pela rede de haplótipos (Figura 11).

A análise da variância molecular AMOVA revelou que a maior parte da variação nos dados (96,29%) foi devido a diferenças dentro das populações ( $F_{ST} = 0,037$ ;  $P < 0,05$ ) e somente 3,71% da variância foi devido a diferenciação entre as populações amostradas (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise da variância molecular (AMOVA) para as populações de *Plagioscion squamosissimus*. A estrutura de grupo testada foi um grupo constituído por populações de Santarém, Alenquer, Monte Alegre e Juruti.

| Fonte de Variação     | Componentes de Variância | Porcentagem de Variação | F/ $\Phi_{ST}$ | P     |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|----------------|-------|
| Entre as populações   | 0,106                    | 3,71                    | 0,0371         | <0,05 |
| Dentro das populações | 2,748                    | 96,29                   |                |       |
| Total                 | 2,854                    |                         |                |       |

Os resultados de  $F_{ST}$  indicam que não há diferença significativa entre a população de Alenquer com outros três municípios, porém foi observada uma diferença significativa, ainda que pequena, entre Santarém-Monte Alegre e Santarém-Juruti (Tabela 8).

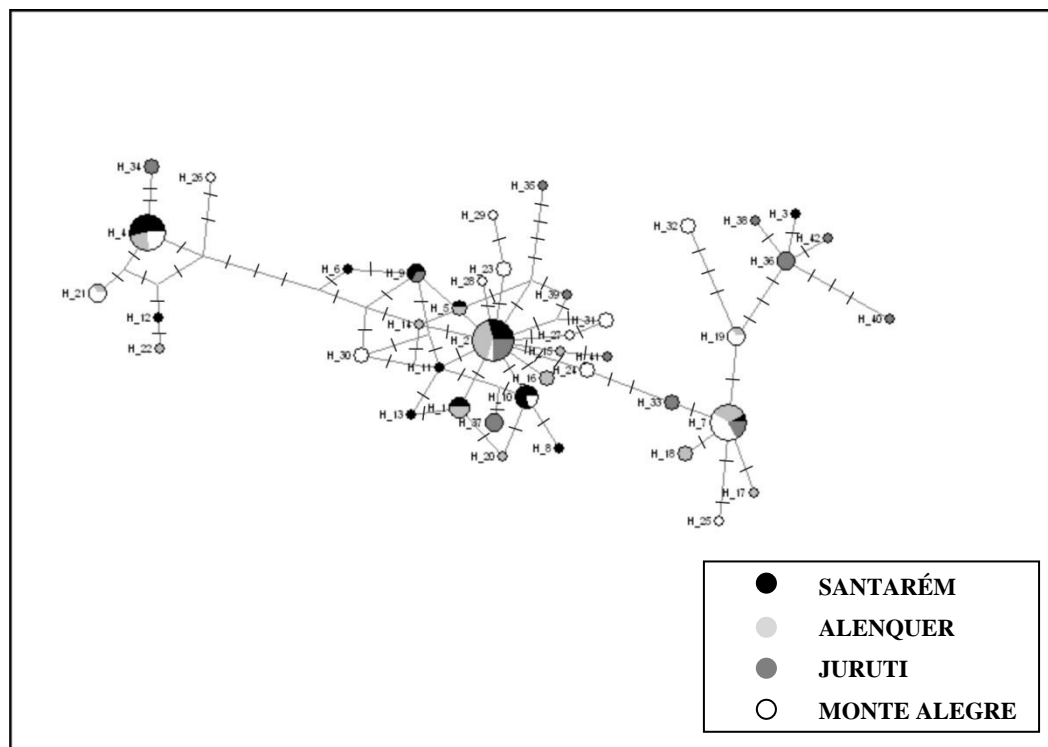
**Tabela 8.** Índice de fixação ( $F_{ST}$ ) entre os pares de populações de *P. squamosissimus*.

|              | Santarém | Alenquer | Monte Alegre |
|--------------|----------|----------|--------------|
| Santarém     |          |          |              |
| Alenquer     | 0,019    |          |              |
| Monte Alegre | 0,068*   | - 0,002  |              |
| Juruti       | 0,081*   | 0,033    | 0,024        |

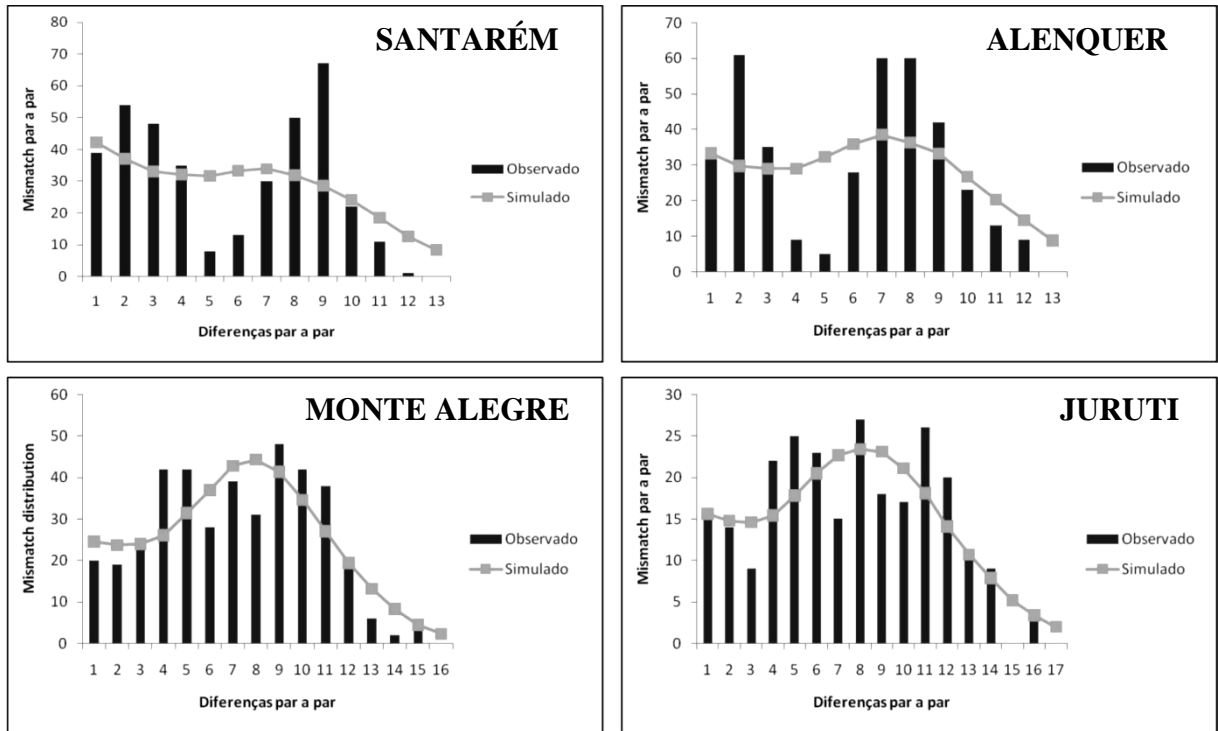
\*Diferenciação significativa ao nível de 0,05.

O teste de Mantel, o qual foi utilizado para verificar se havia correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das populações de *P. squamosissimus*, resultou em baixa e não significativa correlação entre distância genética e geográfica das populações analisadas ( $r = 0,083$ ;  $P > 0,05$ ).

Os testes de neutralidade de Tajima ( $D$ ) e Fu ( $F_s$ ) foram negativos e não significativos para todas as populações (Tabela 6). A curva de *mismatch* mostrou um padrão multimodal para todas as populações avaliadas (Figura 12). Os valores de Raggedness foram baixos em todas as populações e os índices de SSD não foram significativos para os grupos avaliados (Tabela 9).



**Figura 11.** Rede de haplótipos baseada nos sítios polimórficos da região controle do DNAm de *P. squamosissimus*. Áreas dos círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos e os traços indicam o número de mutações entre cada haplótipo.



**Figura 12.** Distribuição *mismatch* das diferenças par a par entre os pares de haplótipos para as populações de *P. squamosissimus* de Santarém (a), Alenquer (b), Monte Alegre (c) e Juruti(d).

**Tabela 9.** Parâmetros do modelo de expansão súbita e *goodness-of-fit* para *P. squamosissimus*.

|                        | Santarém | Alenquer | Monte Alegre | Juruti |
|------------------------|----------|----------|--------------|--------|
| <b>Parâmetros</b>      |          |          |              |        |
| $\theta_0$             | 0,000    | 0,000    | 0,033        | 1,389  |
| $\theta_1$             | 8,069    | 10,586   | 15,430       | 15,139 |
| $\tau$                 | 8,312    | 7,809    | 8,102        | 7,576  |
| <b>Goodness-of-fit</b> |          |          |              |        |
| SSD                    | 0,0243   | 0,0242   | 0,0056       | 0,0059 |
| <i>P</i>               | 0,4070   | 0,2820   | 0,7890       | 0,8560 |
| Ragged                 | 0,0308   | 0,0321   | 0,0097       | 0,0127 |
| <i>P</i>               | 0,6920   | 0,5380   | 0,9450       | 0,9150 |

**Síglas:**  $\theta_0$ - tamanho populacional antes da expansão;  $\theta_1$ - tamanho populacional após a expansão;  $\tau$ - parâmetro de expansão; SSD- soma dos desvios quadrados; Ragged. - índice de *Raggedness*.

### 3.2.2.2 *Plagioscion auratus*

Nas análises realizadas em 644 pares de bases da região controle do DNAm<sub>t</sub> de 91 espécimes de *P. auratus* foram verificados 31 haplótipos distintos com 46 sítios polimórficos.

Dos 31 haplótipos encontrados para *P. auratus*, 17 foram únicos (54,8%), apenas um foi mais frequente (H13) com 32 indivíduos compartilhando-o, e os demais haplótipos foram representados por 2 a 5 indivíduos (Tabela 3).

A diversidade haplotípica observada foi elevada nas populações de *P. auratus* de Santarém ( $h = 0,97$ ) e Alenquer ( $h = 0,96$ ) e baixa na população de Bragança ( $h = 0,06$ ). Similarmente a diversidade nucleotídica foi elevada em Santarém e Alenquer ( $\pi = 1,2$  e  $1,4\%$  respectivamente) e baixa em Bragança ( $\pi = 0,1\%$ ), sendo este último o resultado de apenas dois haplótipos em 31 espécimes analisados (Tabela 10).

A Rede de haplótipos não revela estruturação espacial entre as populações avaliadas uma vez que vários haplótipos foram compartilhados entre Santarém e Alenquer, o H7 foi presente em todas as populações, e que o haplótipo mais frequente foi compartilhado entre Santarém e Bragança (Figura 13).

**Tabela 10.** Índices de diversidade genética para populações de *Plagioscion auratus*.

| População    | N   | NH | Diversidade Haplotípica( $h$ ) | Diversidade Nucleotídica( $\pi$ ) | Teste de Tajima D | Teste de Fu $F_s$ |
|--------------|-----|----|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| Santarém     | 35  | 23 | 0,970±0,0146                   | 0,012±0,0063                      | -0,6838           | -7,8144*          |
| Alenquer     | 25  | 15 | 0,960±0,0192                   | 0,014±0,0072                      | 0,3554            | -1,6762           |
| Bragança     | 31  | 2  | 0,065±0,0594                   | 0,001±0,0005                      | -1,8892*          | 0,5145            |
| <b>Total</b> | 108 | 31 |                                |                                   |                   |                   |

**Siglas:** N - número de amostras sequenciadas; NH - número de haplótipos. \*Significante ao nível de 0,05.

De maneira similar ao encontrado na pescada branca a maior parte da variância nos dados da AMOVA (79,35%) foi devido a diferença dentro das populações e apenas 25,65% da variação foi decorrente das diferenças entre as populações ( $F_{ST} = 0,207$ ;  $P < 0,01$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11.** AMOVA para as populações de *P. auratus*. A estrutura de grupo testada foi: um grupo constituído por populações dos municípios de Santarém, Alenquer e Bragança.

| Fonte de Variação     | Componentes de Variância | Porcentagem de Variação | $F/\Phi_{ST}$ | $P$    |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|--------|
| Entre as populações   | 47,899                   | 20,65                   | 0,207         | < 0,01 |
| Dentro das populações | 238,860                  | 79,35                   |               |        |
| Total                 | 286,759                  |                         |               |        |

Os valores do  $F_{ST}$  encontrados indicaram que não há diferença significativa entre as populações de *P. auratus* de Santarém e Alenquer. Porém, indicaram uma diferenciação significativa entre as populações de Bragança com relação à Alenquer e Santarém (Tabela 12).



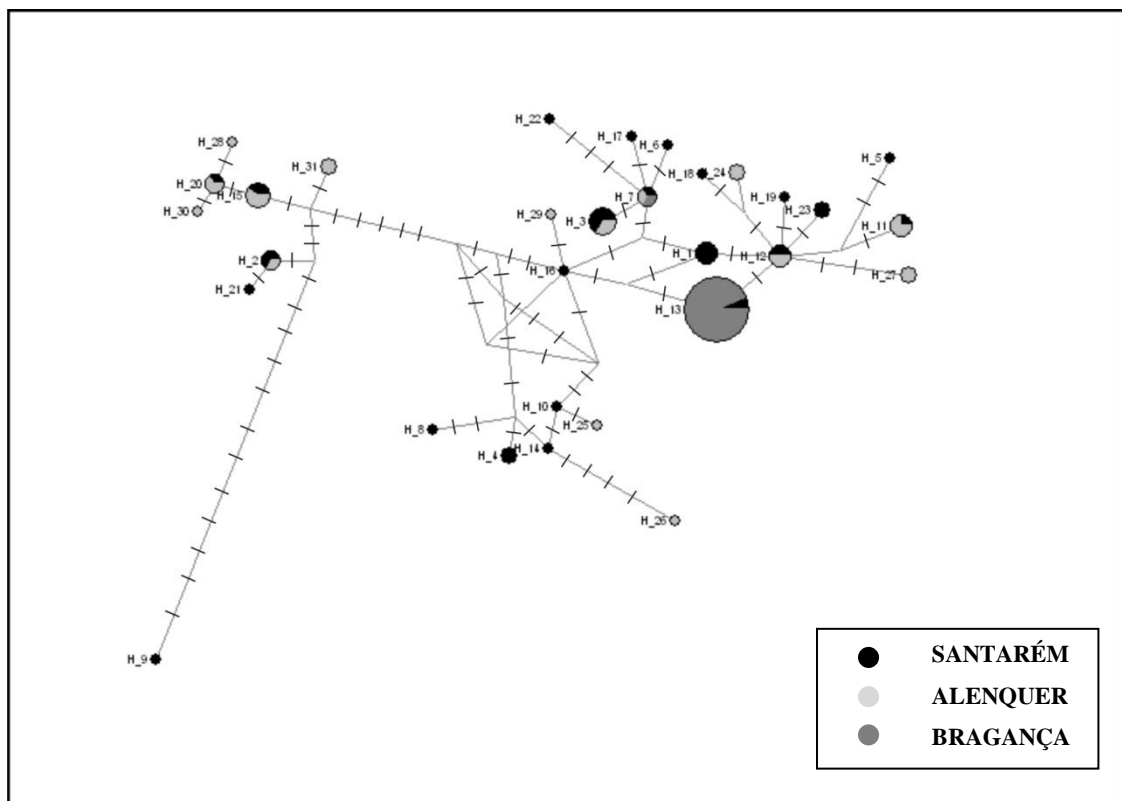
**Tabela 12.** Índice de fixação ( $F_{ST}$ ) entre os pares de populações de *P. auratus*.

|          | Santarém | Alenquer |
|----------|----------|----------|
| Santarém |          |          |
| Alenquer | 0,023    |          |
| Bragança | 0,281*   | 0,380*   |

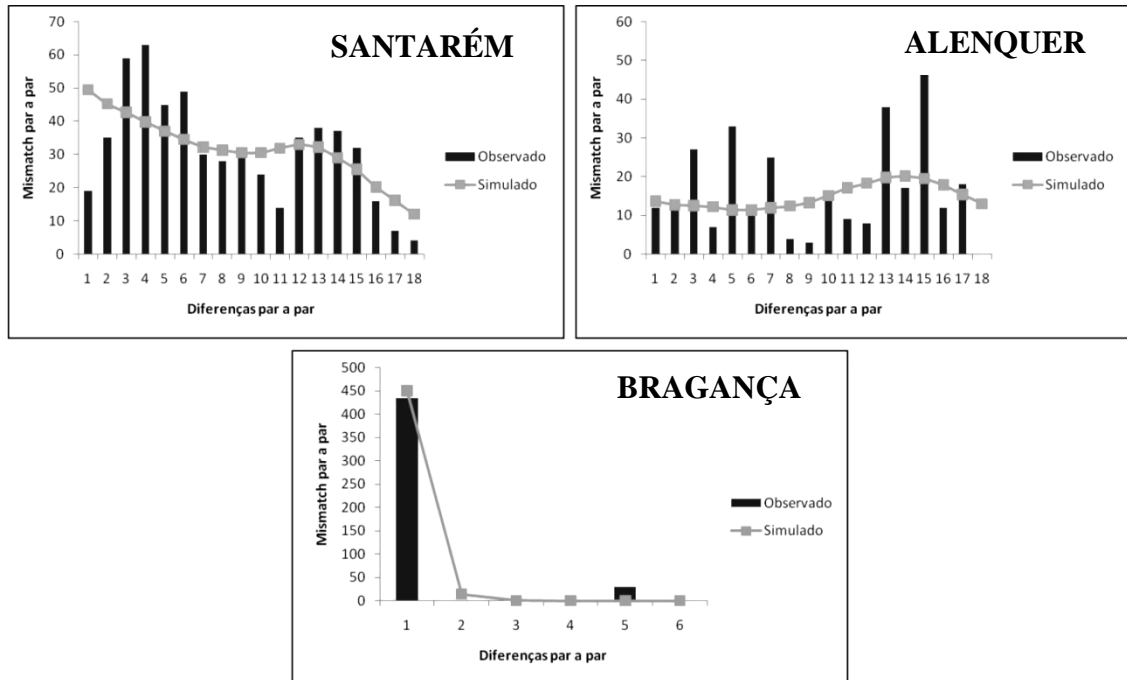
\* Diferenciação significativa ao nível de 0,05.

O teste de neutralidade  $D$  de Tajima foi negativo e significativo apenas para Bragança enquanto que o teste  $F_s$  de Fu foi negativo e significativo somente para Santarém (Tabela 10).

Os valores de Ruggedness foram baixos para Santarém, Alenquer, mas elevado para Bragança. Os resultados de SSD não foram significativos para nenhuma das populações analisadas (Tabela 12). As curvas de *mismatch* observadas em Santarém e Alenquer mostraram padrão multimodal, enquanto que o resultado atípico da curva de *mismatch* de Bragança deve ser resultado de apenas dois haplótipos presentes nesta população (Figura 14).



**Figura 13.** Rede de haplótipos baseada nos sítios polimórficos da região controle do DNA mitocondrial de *P. auratus*. Áreas dos círculos são proporcionais a frequência dos haplótipos e os traços indicam o número de mutações.



**Figura 14.** Distribuição das diferenças par a par entre os pares de haplótipos para as populações de *P. auratus* de Santarém (a), Alenquer (b) e Bragança (c).

**Tabela 13.** Parâmetros do modelo de expansão súbita e *goodness-of-fit* para *P. auratus*.

|                        | Santarém | Alenquer | Bragança |
|------------------------|----------|----------|----------|
| <b>Parâmetros</b>      |          |          |          |
| $\theta_0$             | 0,000    | 0,004    | 0,000    |
| $\theta_1$             | 10,994   | 21,204   | 0,035    |
| $\tau$                 | 13,145   | 14,574   | 3,000    |
| <b>Goodness-of-fit</b> |          |          |          |
| SSD                    | 0,0092   | 0,0286   | 0,0061   |
| <i>P</i>               | 0,8421   | 0,0905   | 0,0619   |
| Ragged                 | 0,0076   | 0,0780   | 0,8834   |
| <i>P</i>               | 0,9849   | 0,0444   | 0,8769   |

**Síglas:**  $\theta_0$ - tamanho populacional antes da expansão;  $\theta_1$ - tamanho populacional após a expansão;  $\tau$ - parâmetro de expansão; SSD- soma dos desvios quadrados; Ragged.- índice de *Raggedness*.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E POPULACIONAIS INTERESPECÍFICAS

Nas análises filogenéticas de *Plagioscion squamosissimus* e *P. auratus* as árvores de máxima verossimilhança geradas a partir do DNA mitocondrial e nuclear foram concordantes e separaram os dois táxons em clados reciprocamente monofiléticos, com elevado suporte estatístico (Figura 8 e 9). Em filogenias geradas com COI do DNAm (Cunha, 2007) e Tmo-4C4 do DNA nuclear (Ferreira, 2008). Além disso, na comparação das sequências de *P. squamosissimus* e *P. auratus*, no presente trabalho, foi observada uma alta divergência nucleotídica, já dentro de cada espécie essa divergência foi baixa. Portanto, os clados reciprocamente monofiléticos e a elevada divergência genética entre os dois grupos permitem a afirmação de que *P. squamosissimus* e *P. auratus* são espécies distintas de acordo com o conceito filogenético de espécies, o qual para Cracraft (1983) é “o menor conjunto diagnosticável de indivíduos dentro do qual há um padrão parental de ancestralidade e descendência”.

A COI, utilizada por Cunha (2007), tem se mostrado útil para identificação de espécies (Herbert, 2003; Ward *et al.*, 2008; Holmes *et al.*, 2009). Enquanto que a Tmo-4C4 utilizada por Ferreira (2008), com as mesmas amostras do trabalho de Cunha (2007), é um marcador que vem sendo muito utilizado em análises filogenéticas de gêneros e famílias de peixes (Rüber *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2008) e têm se mostrado eficaz quando em conjunto com marcadores mitocondriais na identificação ao nível de espécies (Byrkjedal *et al.*, 2007; Musilová *et al.*, 2009; Viñas *et al.*, 2010).

Para explicar os resultados obtidos, Cunha (2007) e Ferreira (2008) levantaram as hipóteses de: a) erro de identificação morfológica, b) mesma espécie com diferentes padrões de coloração devido a adaptações morfológicas a diferentes habitats, c) hibridização e/ou introgressão de linhagem, d) retenção de polimorfismo ancestral. A primeira hipótese foi logo descartada pelos autores, segundo eles, por serem os indivíduos *P. auratus* e *P. squamosissimus* facilmente identificáveis pela coloração, a qual é escura na primeira e prateada na segunda espécie. Sobre isso Casatti (2005) ressalta que ocasionalmente podem ser encontrados indivíduos de *P. auratus* de coloração clara, assim como indivíduos de *P. squamosissimus* podem apresentar coloração escura. Além do mais, algumas características na chave de identificação se sobrepõem e podem levar a interpretações equivocadas.

As análises populacionais interespecíficas também indicaram claramente uma separação entre *P. squamosissimus* e *P. auratus*. A AMOVA revelou que a maior parte da variância dos dados ocorreu entre os dois táxons apoiados por valores significativos de  $F_{CT}$ . O índice de fixação ( $F_{ST}$ ) apresentou valores próximos a um evidenciando a ausência de fluxo gênico mediado por fêmeas entre essas populações. A rede de haplótipos também exibiu um padrão diferenciando as duas espécies com os haplogrupos separados por um número muito elevado de mutações. Estes dados corroboram a proposta de duas espécies distintas para estes táxons, as quais também podem ser classificadas de acordo com o conceito biológico de espécies que, de acordo com Mayr (1963) “são grupos de populações naturais capazes de inter cruzar e produzir descendentes férteis, e isolados reprodutivamente de outros grupos”.

Portanto, os resultados das análises filogenéticas e populacionais do presente trabalho, confirmam que os táxons avaliados são espécies distintas e sugerem que a similaridade genética detectada por Cunha (2007) e Ferreira (2008) foi devido a erros de identificação dos exemplares amostrados em Bragança, que apresentam plasticidade fenotípica, uma vez que todos são *P. auratus*, mas alguns são prateados, o que é característico de *P. squamosissimus*, e outros escuros como é característico desta espécie.

#### 4.2 ANÁLISES POPULACIONAIS INTRAESPECÍFICAS

As análises populacionais para a pescada branca, *P. squamosissimus*, indicaram elevadas diversidade haplotípica e nucleotídica em Santarém, Monte Alegre e Juruti (Tabela 6). O mesmo padrão foi detectado para a pescada preta, *P. auratus*, coletada em Santarém e Alenquer (Tabela 10). Altos índices de diversidade genética são para Grant & Bowen (1998) “indícios de grandes populações estáveis com longa história evolucionária ao longo do tempo ou contato secundário entre linhagens distintas”. Por outro lado, espécimes de pescada branca de Alenquer apresentaram elevada diversidade haplotípica, mas baixa diversidade nucleotídica (Tabela 6) o que “indicam populações que passaram por gargalo de garrafa seguido de rápido crescimento e acúmulo de mutações”(Grant e Bowen, 1998). Para a população de pescada preta de Bragança os índices de diversidade genética foram baixos (Tabela 10) o que é “indício de gargalo de garrafa recente ou efeito de fundador promovido por uma ou poucas linhagens de DNAmt” (Grant e Bowen, 1998).

Os testes de neutralidade  $D$  e  $F_s$ , que além de avaliarem se a região genômica evolui de forma neutra também são úteis para fazer inferências demográficas, não foram significantes nas populações de pescada branca (Tabela 6), indicando que a região controle não está sob

pressão seletiva neste táxon e corroborando a hipótese de estabilidade populacional de Grant & Bowen (1998) para as populações de Santarém, Monte Alegre e Juruti. No entanto, a hipótese de gargalo de garrafa seguido por expansão populacional não deve ser o fator responsável pela diversidade encontrada em Alenquer, o que pode ser evidenciado pelos valores não significantes dos testes de neutralidade (Tabela 6) e padrão multimodal da *mismatch distribution* (Figura 13), o qual é típico de populações estáveis ao longo do tempo.

Para a pescada preta, apesar do teste *D* de Tajima indicar ausência de fatores seletivos agindo na região controle para Santarém e Alenquer, este foi negativo e significativo para Bragança (Tabela 10). Resultado similar, valor negativo e significativo, foi detectado para o teste *F<sub>s</sub>* de Fu para Santarém e sugerem que seleção *background*, efeito carona ou expansão populacional possam estar ocorrendo nas populações de Bragança e Santarém. Os resultados de Raggedness e SSD (Tabela 12) não rejeitam a hipótese de expansão para estas populações. Por outro lado, a curva multimodal de *mismatch distribution* para Santarém (Figura 14) sugere populações estáveis ao longo do tempo (Rogers e Harpending, 1992), de forma que seleção pode ser o fator responsável pelos padrões observados nesta população, mas estudos adicionais devem ser realizados para comprovar ou refutar esta hipótese para as pescadas pretas de Santarém. Para Bragança, o padrão atípico observado no gráfico de *mismatch distribution* (Figura 14) deve ser resultado do pequeno número de haplótipos presentes nesta população (Tabela 10), impossibilitando-nos de fazer inferências demográficas para esta.

Outro fator reconhecidamente responsável pela redução da diversidade genética é a pesca predatória, mas esta não deve ser a causa da baixa variabilidade nucleotídica da pescada branca em Alenquer e da pescada preta em Bragança. A pescada branca é alvo da frota comercial ao longo de toda sua área de ocorrência o que inclui as demais populações amostradas no presente trabalho. Já a pescada preta é um recurso que ocasionalmente é comercializado em Bragança, uma vez que peixes marinhos são os principais recursos pesqueiros da região bragantina (MMA, 2010). Trabalhos realizados com a pescada branca ao longo da calha principal do Amazonas e seus tributários, também utilizando a região controle, encontraram elevados índices de diversidade genética para a espécie (Soares, 2008; Galletti, 2009). Além do mais, várias espécies comercialmente exploradas e reconhecidamente em estado de sobrepesca (Ex.: dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii* – Batista e Alves-Gomes, 2006; pargos - *Lutjanus purpureus* e *L. Campechanus* – Gomes *et al.*, 2008; tambaqui - *Colossoma macropomum* – Santos *et al.*, 2007; pescada-goete - *Cynoscion jamaicensis* – Alencar, 2009) apresentam alta variabilidade genética, o que sugere que a pressão pesqueira não deve exercer influência, a curto prazo, na diversidade genética. Portanto, os parâmetros

populacionais dos indivíduos de Alenquer parecem refletir seu *status* ao longo do tempo evolutivo e não seu atual estado demográfico. Em todo o caso, políticas efetivas de manejo dos estoques de pescadas branca e preta devem ser elaboradas, uma vez que a maioria dos haplótipos foi única e a perda desta variabilidade, seja por deriva randômica ou por pressão pesqueira, poderá causar danos ao patrimônio genético da espécie reduzindo o seu potencial evolucionário.

Para a pescada preta, a baixa variabilidade genética e o número reduzido de haplótipos (Tabela 10), sugerem a ocorrência de efeito de fundador para a população de Bragança o que segundo Hartl (2008) ocorre quando um pequeno grupo de indivíduos, oriundos de uma população estabelecida, funda uma nova população resultando em um afinamento populacional severo. Para explicar este fenômeno duas hipóteses podem ser sugeridas: a) a colonização por indivíduos oriundos de tributários amazônicos para o estuário do rio Caeté (que banha Bragança) por conexões existentes entre estes rios; b) introdução antrópica, intencional ou acidentalmente, para o rio Caeté. De acordo com a carta geológica da CPRM – Serviço Geológico do Brasil (Costa e Ricce, 2000) atualmente o Caeté não é conectado com rios da bacia Amazônica, ou mesmo com tributários que se conectam a esta. Porém, se este fosse o fator que permitiu a entrada da pescada preta no estuário do Caeté a sua diversidade genética deveria ser mais elevada do que a atualmente detectada. Por outro lado, a liberação de exemplares por ação antrópica pode ter ocorrido em um tempo mais recente, e como no nordeste do Pará existem registros de aquiculturas de água doce, embora não seja registrado o cultivo de pescada preta ou branca, este cenário seria mais provável para explicar a baixa diversidade genética detectada para a pescada preta em Bragança. Um fato intrigante é que a literatura só registra introduções de pescada branca (*P. squamosissimus*) em diferentes regiões do Brasil (Dourado, 1976; Agostinho *et al.*, 2004; Casatti, 2005), mas como em Bragança indivíduos de pescada preta com coloração prateada, similares ao padrão de cor da pescada branca são comuns no rio Caeté (Figura 15), é provável que estes tenham sido erroneamente identificados como *P. squamosissimus* e trazidos para a área. É importante ressaltar que estudos mais aprofundados devem ser realizados para verificar qual destes cenários é mais apropriado para explicar o padrão detectado para a pescada preta em Bragança.

A estrutura das populações de pescada branca aqui avaliadas por AMOVA e  $F_{ST}$  mostrou que a maior parte da variação genética dos dados está relacionada a diferenças dentro das populações, embora o  $F_{ST}$  indique baixa, porém significativa, diferenciação entre a população de Santarém daquelas de Monte Alegre e Juruti (Tabelas 7 e 8). Isolamento por distância não foi o fator responsável por tal resultado, uma vez que o teste de Mantel não

mostrou correlação significativa entre distância genética e geográfica. Porém, apesar do padrão migratório da pescada branca não ser plenamente conhecido e os dados disponíveis sugerirem movimentos esporádicos e incertos (Goulding, 1980), e até mesmo sedentarismo para a espécie (Lowe-McConnel, 1999), a fraca sub-estruturação detectada no presente trabalho indica que há fluxo gênico entre as populações de pescada branca no baixo Amazonas.

Diferenciação populacional já foi registrada para *P. squamosissimus* quando Teixeira *et al.* (2002), analisando polimorfismo da Transferrina em quatro populações de pescada branca no estado do Amazonas, encontraram discreta subdivisão naquela área da Amazônia central. No entanto, o padrão detectado refletia diferenciação temporal na frequência dos genótipos uma vez que indivíduos coletados na mesma área, em períodos distintos, apresentavam diferenças entre si. Estes resultados corroboraram dados prévios de análises citogenéticas que sugeriam a presença de sub-populações de pescada branca na Amazônia central (Feldberg *et al.*, 1999). Por outro lado, os trabalhos que utilizaram a região controle para comparar populações de pescada branca da calha principal do rio Amazonas (Amazonas e Pará - Galletti, 2009; e Médio Amazonas - Soares, 2008) sugerem que estas sejam consideradas panmíticas. Soares (2008) detectou diferenciação significativa apenas entre populações dos rios Amazonas e Tapajós ao qual foram sugeridas as hipóteses de isolamento geográfico, o que não foi testado; e adaptações das populações às diferentes características físico-químicas das águas que estas habitam. Galletti (2009) detectou subdivisão, embora baixa, apenas entre populações dos extremos de amostragem (Tabatinga – AM e Soure – PA) para o qual isolamento por distância foi descartado pelo teste de Mantel e outra hipótese não foi proposta para explicar tal diferenciação.

As análises de AMOVA e  $F_{ST}$  (Tabelas 11 e 12) e a rede de haplótipos (Figura 13) revelam que a pescada preta pode ser considerada uma população panmítica no médio Amazonas, a exemplo do que foi detectado para a pescada branca. Somente Bragança diferiu significativamente das populações de Santarém e Alenquer, mas este foi resultado do pequeno número de haplótipos presentes em Bragança. É importante ressaltar que os dois haplótipos de Bragança são compartilhados com populações de Alenquer e/ou Santarém, indicando que mesmo esta tem uma origem compartilhada com as populações do baixo Amazonas. Portanto, é provável que a diferenciação genética detectada entre Bragança e as demais populações deva-se à deriva genética randômica na frequência dos haplótipos promovidos pelo efeito de fundador (Beebee e Rowe, 2008), uma vez que apenas um pequeno número de indivíduos da população original contribuiu para a fundação da população de Bragança.

Estudos genéticos com o pirarucu (*Arapaima gigas*), um dos peixes mais importantes economicamente e sobre-explorado na sua área de ocorrência, que a exemplo da pescada branca não é capaz de migrar longas distâncias, encontraram homogeneidade genética, ao nível do DNAm (NADH1, ATPases 6 e 8, tRNAs lisina e leucina, porções das COII, COIII e do rNRA16S), entre populações ao longo da bacia Amazônica e só detectaram fraca estruturação genética com isolamento, avaliando 14 locos microssatélites, em áreas com distâncias superiores a 2.500 km (Hrbek *et al.*, 2007). Estes resultados são similares aos encontrados para a pescada branca por Soares (2008); Galletti (2009) e para a maioria das populações avaliadas no presente trabalho.

Estudos genéticos em peixes amazônicos revelam que panmixia é comum em espécies migradoras, e é resultado de fluxo gênico proporcionado por dispersão a longas distâncias tal como foi descrito para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii* - Batista e Alves-Gomes, 2006; Batista, 2010), a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii* - Formiga-Aquino, 2004; Batista *et al.*, 2005; Rodrigues, 2009), o tambaqui (*Colossoma macropomum* - Santos *et al.*, 2007), o jaraqui de escama grossa (*Semaprochilodus insignis* - Batalha, 2009). Casos de sub-estruturação genética já foram detectados para espécies que apresentam comportamento migratório, com é o caso da piraíba (*B. filamentosum*) para a qual foram detectados três estoques distintos na Amazônia brasileira associados a um padrão de segregação por tributários com diferentes características físico-químicas da água (rios de água clara, branca e preta) (Huerdo, 2009). Para *Prochilodus corruscans*, um bagre migrador da bacia dos rios Paraná/Paraguai, foi detectado estruturação populacional mesmo quando comparando espécimes co-existentes e co-migrantes ao longo da calha principal do rio, o que fez os autores sugerirem o primeiro caso de comportamento de filopatria ou *homing* em bagres de água doce da América do Sul (Pereira *et al.*, 2009).

Considerando que migração a longas distâncias não deve ser o fator responsável pela panmixia detectada para as pescadas brancas e pretas ao longo da bacia Amazônica, podemos sugerir que este padrão esteja relacionado ao sistema de várzea que promove ampla conexão dos tributários, lagos e calha principal do Amazonas durante épocas de cheia favorecendo o fluxo gênico entre espécimes de locais distintos, o que já foi proposto por outros autores para explicar padrões similares em peixes amazônicos (Batista, 2010).



## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se afirmar que:

- a) *Plagioscion squamosissimus* e *Plagioscion auratus* são espécies distintas;
- b) As populações de *P. squamosissimus* e *P. auratus* do médio Amazonas apresentam padrões de diversidade e história demográfica típicos de populações estáveis com longa história evolucionária;
- c) *P. squamosissimus* é constituída por populações conectadas por fluxo gênico mediado por fêmeas ao longo da calha do Amazonas;
- d) *P. auratus* deve ser considerada uma população panmítica no médio Amazonas;
- e) *P. auratus* de Bragança teve origem a partir de populações da calha do Amazonas e difere destas por deriva genética randômica em consequência do efeito fundador;
- f) O padrão de homogeneidade genética observada para as duas espécies pode estar relacionado aos pulsos de inundação que conectam lagos e tributários da calha principal do Amazonas durante os períodos de cheia da várzea amazônica;
- g) Os táxons devem ser manejados de forma distinta.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; LATINI, J. D. Fisheries management in brazilian reservoirs: lessons from/for South América. **Interciência**, 29 (6): 334-338. 2004.
- ALENCAR, S. S. C. **Variabilidade genética e estrutura populacional da pescada-goete *Cynoscion jamaicensis* do Norte e Sudeste do Brasil**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Pará, Bragança - PA. 35pp. 2009.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36: 315.2009.
- BALLARD, J. W. O.; RAND D. M. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implication. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, 36: 621-642. 2005.
- BARBOSA, N. D. **Avaliação da biologia reprodutiva de *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) e *Plagioscion surinamensis* (Bleeker, 1873) no terminal de Vila do Conde e área adjacente (Barcarena – PA)**. Dissertação de mestrado. UFPA. Belém-PA. 100pp. 2009.
- BATALHA, K. P. **Genética populacional do jaraqui de escama grossa (*Semaprochilodus insignis* - Prochilodontidae, Characiformes)**. Dissertação de Mestrado. Manaus: UFAM. 57 p. 2009.
- BATISTA J. S. et. al. **Variabilidade genética da dourada e da piramutaba na bacia amazônica**. In: FABRÉ, N. N. and BARTHEM, R. B. O Manejo da Pesca dos Grandes Bagres Migradores. Manaus: Provárzea/IBAMA. p: 15-18. 2005.
- BATISTA, J. S.; ALVES-GOMES, J. A. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. **Genetics and Molecular Research**, 5: 723-740. 2006.
- BATISTA, J. S. **Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo**. Tese de doutorado. Manaus. GCBEv/INPA. 148 p. 2010.
- BEEBEE, T. ; ROWE G. **An Introduction to Molecular Ecology**. 2nd Edition, Oxford University Press Inc., New York. 400pp. 2008.
- BELKIR, K. **GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire genome et population, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France)**. 2001.
- BOUJARD, T. et al. **Poisons de Guyane. Guide écologique de l’Approuague et de la réserve des Nauragues**. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 219p. 1997.
- BROWN, K. H. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance, and functional variation. **Journal of fish biology**, 72: 355-374. 2008.

- BYRKJEDAL, I.; REES D. J.; WILLASSEN, E. (2007) Lumping lupsuckers: molecular and morphological insights into the taxonomic status of *Eumicrotremus spinosus* (Fabricius, 1776) and *Eumicrotremus eggvinni*. Koefoed, 1956 (Teleostei: Cyclopteridae). **Journal of Fish Biology**, 71(Supplement A): 111-131. 2007.
- CASATTI, L. Sciaenidae (Drums or croakers). *In*: R. E. REIS, S. O. KULLANDER AND C. J. FERRARIS, Jr. (eds.) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil. p. 599-602. 2003.
- CASATTI, L. Revision of the South American freshwater genus *Plagioscion* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). **Zootaxa**, 1080: 39–64. 2005.
- CASTRO, A. C. L. Tamanho e idade de primeira maturação da corvina, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Teleostei, Sciaenidae) do reservatório de Barra Bonita-SP. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi ser. Zool.**, 15(2): 119-133. 1999.
- CHAO, L. N. A basis for classifying western Atlantic Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). NOAA. Technical report NMFS, Circular, 415: 1-64. 1978.
- COSTA, J. L.; RICCE P. S. F. **Programa Levantamentos Geológicos Básicos do Brasil – Carta Geológica**. CPRM, Serviço Geológico do Brasil. 2000.
- CRACRAFT, J. Species concepts and speciation analysis. **Curr. Ornithl.**, 1: 159-187. 1983.
- CUNHA, M. F. G. **Filogenia dos Sciaenidae (Perciformes) da costa brasileira baseada no gene mitocondrial Citocromo Oxidase C subunidade I**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Pará. Bragança – PA. 27 pp. 2007.
- DOURADO, O. F. **A seletividade do galão (gill-net) para a pescada-do-piauí, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel), no açude público “Arrojado Lisboa” (Quixadá, Ceará, Brasil)**. Boletim técnico do DNOCS, Fortaleza, 34 (1): 67-77. 1976.
- EXCOFFIER, L. G. L.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1:47-50. 2005.
- FARIAS, I. P.; ORTÍ, G.; MEYER, A. Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetics of Cichlid fishes. **Jornal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)**, 288: 76-92. 2000.
- FELDBERG, E. et al. Cytogenetic studies of two freshwater scianids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Scianidae) from the Central Amazon. **Genet. Mol. Biol.**, 22: 351-356. 1999.
- FERREIRA, A. R. S. **Análise das relações filogenéticas entre os Sciaenidae da costa Norte do Brasil usando a região nuclear TMO-4C4**. Relatório de Iniciação Científica, PIBIC-INTERIOR/CNPq. Universidade Federal do Pará. Bragança– PA. 14 pp. 2008.
- FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S; SANTOS, G. M. **Peixes comerciais do Médio Amazonas: região de Santarém, Pará**. Brasília: Edições IBAMA. 211pp.1998.

FORMIGA- AQUINO K. **Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Velenciennes, 1840) (Siluriformes- Pimelodidae) no sistema Estuário- Amazonas-Solimões.** Dissertação de Mestrado. Manaus. CPBA, INPA/UA. 2004. 73 p. 2004.

FRANKHAM, R.; BALLOU J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 280pp. 2008.

FRIEDLANDER, T. P.; REGIER, J. C.; MITTER, C. Nuclear gene sequences for higher level phylogenetic analysis: 14 promising candidates. **Syst. Biol.**, 41: 483-490. 1992

FROESE, R.; PAULY, D. **Fishbase, 2010.** Disponível em: <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 05 mai.2010, 21:30:00.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, 147: 915-925. 1997.

GALLETTI, E. **Distribuição da variabilidade genética da pescada, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) na calha do rio Amazonas.** Dissertação de Mestrado. INPA. Manaus-AM. 68 pp. 2009.

GOMES, G. et al. Can *Lutjanus purpureus* (South red snapper) be “legally” considered a red snapper (*Lutjanus campechanus*)?. **Genetics and Molecular Biology**. 31 (1): 372-376. 2008.

GOULDING, M. **The Fishes and the Forest, Explorations in Amazonian Natural History.** University of California Press, Berkeley, CA, USA. 1980.

GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow populations histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of Heredity**, 89: 415-426. 1998.

GUINDON, S.; GASCUEL O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, 52: 696-704. 2003.

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

HARPENDIG, H. C. Signature of ancient population growth in a low- resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Hum.Biol.**, 66: 591-600. 1994.

HARTL, D. L. **Princípios de Genética de Populações.** 3ª ed. Funpec Editora, Ribeirão Preto, SP. 217pp. 2008.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 270: 96-99. 2003.

HRBEK, T.; CROSSA, M.; FARIAS, I. P. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. **Braz. J. Biol.**, 67 (4, suppl.): 909-917. 2007.

HOLMES, B. H. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. **Fisheries Research**, 95: 280-288.2009.

HUERGO, G. M. **Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1919) e da piraíba negra (*B. capapretum* Lundberg and Akama, 2005), na Amazônia brasileira, inferidas através de DNA mitocondrial: subsídio para manejo e conservação.** Tese de Doutorado. Manaus. INPA. BADPI. 114 p. 2009.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis): **Estatística de pesca (2003-2007) Brasil. Grandes regiões e unidades da federação.** Brasília. Disponível em: [www.ibama.gov.br/rec\\_pesqueiros/download.php?id\\_menu=93](http://www.ibama.gov.br/rec_pesqueiros/download.php?id_menu=93). Acesso em: 11 nov. 2009, 12:20:00.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) **Base cartográfica Hidrografia. 2011.** Disponível em: <ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas/planimetricos/plani100/projetoMAPA/ArquivosVetoriais> > Acesso em: 02 jun. 2011, 10:31:00.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotid sequences. **Jornal of Mol. Evol.**, 16: 111-120. 1980.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25: 1451-1452. 2009.

LONG, E. O.; DAVID, I. D. Repeat genes in eukaryotes. **Ann Rev Biochem**, 41: 727-764. 1980.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais.** Edusp, São Paulo. 534p. 1999.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and the generalized regression approach. **Cancer Res.**, 27: 209-220. 1967.

MAYR, E. **Animal Species and Evolution.** Harward University Press, Cambridge. 1963

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil, IV Teleostei.** São Paulo. 96p. 1980.

MPA – MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Produção pesqueira e aquícola: estatística 2008 e 2009.** Brasília-DF. 2010.

MUSILOVÁ, Z.; SCHINDLER, I.; STAECK, W. Description of *Andinocara stalsbergi* sp.n. (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatini) from Pacific coastal rivers in Peru, and annotations on the phylogeny of the genus. **Vertebrate Zoology**, 59(2):131-141. 2009.

NELSON, J. S. **Fishes of the World.** 4<sup>a</sup> ed., John Willey and Sons, Inc. New York. 539pp. 2006.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. **MODELTEST: testing the model of DNA substitution.** **Bioinformatics** 14(9): 817–818. 1998.

ROCHA, L. et al. Historical biogeography and speciation in the reef fish genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 48: 918-928. 2008.

RODRIGUES, A. M. et al.. Aspectos da estrutura populacional da pescada do Piauí *Plagioscion squamosissimus*, (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Sciaenidae), na represa de Bariri, Rio Tietê, Estado de São Paulo, Brasil. **Bol Inst Pesca São Paulo**, 15(2): 155-167. 1988.

RODRIGUES, R. et al. Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, Sciaenidae) from the Northern coast of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 31(2): 487-492. 2008.

RODRIGUES, F. C. **Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop em quatro localidades da Amazônia: diferenças entre calha e tributários.** Dissertação de Mestrado. Manaus: INPA. GCBEv. 96 p. 2009.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pair wise differences. **Molecular Biol. Evol.**, 9: 552-559. 1992.

RÜBER, L. et al. Evolutionary and biogeographic patterns of the Badidae (Teleostei: Perciformes) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 32:1010-1022. 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, N. Y.1989.

SANTA BRÍGIDA, E. L. et al. Population analysis of *Scomberomorus cavalla* (Cuvier, 1829) (Perciformes, Scombridae) from the Northern and Northeastern coast of Brazil. **Brazilian J. Biol.**, 67: 919-924. 2007.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus.** Manaus: IBAMA/AM, ProVárzea. 144pp. 2006.

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, 71: 1-12. 2007.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética.** 4ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 903pp. 2008.

SOARES, G. S. **Estrutura genética da pescada branca (*Plagioscion squamosissimus* – Sciaenidae, Perciformes) do rio Tapajós e baixo amazonas a partir de sequências de DNA mitocondrial.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará/Instituto Esperança de Ensino Superior. Santarém-PA. 61pp. 2008.

STREELMAN, J. T. et al. Multilocus phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes): evolutionary comparison of microsatellite and single-copy nuclear loci. **Mol Biol. Evol.**, 15:798-808. 1997.

STREELMAN, J. T.; ALFARO M.; WESTNEAT, M. W.; BELLWOOD, D. R.; KARL, S. A. Evolutionary history of the parrotfishes: biogeography, ecomorphology, and comparative diversity. **Evolution**, 56: 961-971. 2002.

Swofford, D. L. **PAUP\* Phylogenetic analysis using parsimony and other methods, version 4**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2002.

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

TEIXEIRA, A. S., JAMIESON, A.; RAPOSO, J. C. P. Transferrin polymorphism in Central Amazon populations of pescada, *Plagioscion squamosissimus*. **Genet. Mol. Res.**, 1(3): 216-226. 2002.

VIÑAS, J.; ALVARADO, B.; PLA, C. Phylogeography and phylogeny of the epimeric cosmopolitan bonitos of the genus *Sarda* (Courvier): inferred patterns of intra- and inter-oceanic connectivity derived from nuclear and mitochondrial DNA data. **Journal of Biogeography**, 37: 557-570. 2010.

VIÑAS, J. et al. Genetic differentiation between eastern and western Mediterranean swordfish revealed by phylogeographic analysis of the mitochondrial DNA control region. **ICES Journal of Marine Science**, 67: 1222-1229. 2010.

WARD, R. et. al. DNA barcoding Australian fish. **Phil Trans R. Soc.**, 360: 1847-1857. 2005.

WESTNEAT, M. W.; ALFARO, M. E. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the reef fish family Labridae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36: 370- 390. 2005.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, 92: 371-373. 2001.