



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL - CMCA



**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA PIRANHA VERMELHA,
Pygocentrus nattereri (CHARACIFORMES: SERRASALMINAE) COM BASE
NO DNA MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

Luciana Alves da Luz

São Luís - MA

2014

LUCIANA ALVES DA LUZ

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA PIRANHA VERMELHA,
Pygocentrus nattereri (CHARACIFORMES: SERRASALMINAE) COM BASE
NO DNA MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Conservação e Reprodução Animal.

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

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudene Barros - CESC/UEMA

São Luís - MA

2014

Luz, Luciana Alves da.

Estrutura genética de populações da piranha vermelha, *Pygocentrus nattereri* (Characiformes: Serrasalminae) com base no DNA mitocondrial e nuclear/ Luciana Alves da Luz. – São Luis, 2014.

90 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2014.

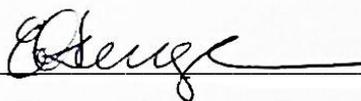
Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga

1.Variabilidade. 2.Maranhão. 3.Manejo. 4.Conservação. I.Título

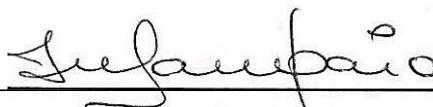
Estrutura genética de populações da piranha vermelha, *Pygocentrus nattereri* (Characiformes: Serrasalminae) com base no DNA Mitocondrial e Nuclear

Luciana Alves da Luz

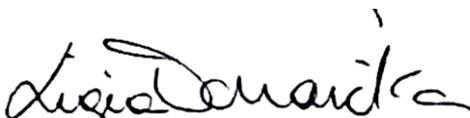
BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio - Membro
Universidade Federal do Pará - UFPA



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

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

São Luís - MA

2014

Dedico a minha amada mãe Valdelice Alves
da Luz e ao meu marido Ideilson Lima Soares por todo amor e carinho.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo e por mais esta vitória;

Ao Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga, pela orientação segura e competente, pela amizade e confiança, essenciais nesta etapa;

A co-orientadora Profa. Dra. Maria Claudene Barros pelo incentivo, ensinamentos e amizade;

A FAPEMA, pela oportunidade de conhecer, aprender e acima de tudo de desenvolver esse projeto, graças à concessão da bolsa de mestrado;

Aos docentes que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pelos ensinamentos valiosos;

A minha amada mãe Valdelice Alves da Luz por todo seu amor, dedicação e apoio;

Ao meu marido Ideilson Lima Soares por todo amor, compreensão e apoio;

A minha querida avó Maria Alves da Luz e irmão Luan da Luz dos Reis (*in memoriam*) por seu amor e confiança, pois onde estiverem sei que estão torcendo e orando por mim;

A minha irmã Luana pela amizade e companheirismo durante as coletas, no laboratório e na vida;

As minhas tias e tios, em especial ao tio Gonzaga, por ter ajudado em parte das coletas, obrigada pela força e confiança;

As minhas primas, em especial Aline e Nicole por estarem sempre ao meu lado;

Aos colegas que fazem do GENBIMOL (Laboratório de Genética e Biologia Molecular) especialmente “Estrela” e Walna;

Aos amigos Carol Sampaio e Thales por terem me acolhido em suas casas durante as etapas de seleção e conclusão do mestrado;

A minha amiga de todas as horas, Nathalya Martins, por ter me ajudado durante as matrículas, pelos telefonemas e e-mails informativos e pelos conselhos dados sempre que necessário;

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho, fica a minha eterna gratidão.

Muito Obrigado!

RESUMO

Estrutura genética de populações da piranha vermelha, *Pygocentrus nattereri* (Characiformes: Serrasalminae) com base no DNA Mitocondrial e Nuclear, Luciana Alves da Luz. Elmary da Costa Fraga, Maria Claudene Barros. 90 p.

A piranha vermelha, *Pygocentrus nattereri*, é um recurso importante para pesca artesanal e comercial. O presente estudo investigou os níveis de variabilidade e estruturação genética entre populações de *P. nattereri* em bacias hidrográficas do Maranhão, com base em sequências do DNA mitocondrial (rRNA 16S, COI e Região Controle) e nuclear (Microssatélites). O DNA foi isolado utilizando o protocolo de Fenol-clorofórmio e as regiões mitocondriais e locos microssatélites foram amplificados por PCR. Os produtos da PCR foram sequenciados usando o método didesoxiterminal. Para o gene rRNA 16S foi obtido um fragmento de 576 pb, 23 haplótipos, $h=0.950$ e $\pi=0.004$. As análises filogenéticas agruparam os espécimes com 99% a 100% de *bootstrap*. Distâncias genéticas entre e dentro das populações variaram de 0 a 1%. O sequenciamento do gene COI resultou em um fragmento de 672 pb, 23 haplótipos, $h=0.940$ e $\pi=0.009$. A AMOVA indicou que a maior parte da variação molecular (64%) ocorre entre os grupos. O índice de fixação foi altamente significativo ($F_{ST}=0.707$, $P < 0.00001$). As análises filogenéticas indicaram uma monofilia entre os espécimes. Distâncias genéticas entre as populações variaram de 0-2% e de 0-1% dentro das populações. Para a Região Controle foi obtido 1040 pb, 41 haplótipos, $h=0.978$ e $\pi=0.009$. Os testes de neutralidade (D e F_s) foram significativos ($P < 0.05$) para a maioria das populações analisadas. A AMOVA indicou que a maior parte da variação molecular (72%) ocorre entre os grupos. O índice de fixação foi altamente significativo ($F_{ST}=0.707$, $P < 0.00001$). As análises filogenéticas indicaram que os espécimes representam um grupo monofilético. Distâncias genéticas entre as populações variaram de 0.8 a 1.9% e $< 0.5\%$ dentro das populações. Os *primers* de microssatélites amplificaram 104 alelos. A heterozigosidade esperada variou de 0.362 a 0.494 e a heterozigosidade observada variou de 0.438 a 0.510. O coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) mostrou um excesso de heterozigotos (valor do f negativo) para todos os locos analisados ($P < 0.05$). A AMOVA indicou que a maior parte da variação molecular (89%) ocorre dentro das populações. O F_{ST} foi de 0.229 com p altamente significativo (<0.00001). A distância genética entre as populações mostrou índices de variação de 0.009 (Mearim/Pindaré) a 0.580 (Parnaíba/Itapecuru). O grau de diferenciação genética encontrada entre os estoques de *P. nattereri* indicam a necessidade para o desenvolvimento de planos de manejo independentes para as bacias hidrográficas analisadas, a fim de preservar a variabilidade genética encontrada nessas populações.

Palavras-chave: Variabilidade, Maranhão, Manejo, Conservação.

ABSTRACT

Structure genetic in the populations of red piranha, *Pygocentrus nattereri* (Characiformes: Serrasalminae) based on DNA Mitochondrial and Nuclear, Luciana Alves da Luz, Elmary da Costa Fraga, Maria Claudene Barros. 90 p.

The red piranha, *Pygocentrus nattereri*, is an important resource for artisanal and commercial fisheries. The present study determines levels structure and genetic variability among populations of *P. nattereri* in basins hydrographic of Maranhão based on mitochondrial DNA sequences (rRNA 16S, COI e Control Region) and Nuclear (Microsatellites). The DNA was isolated using a standard phenol-chloroform protocol and mitochondrial regions and microsatellite loci were amplified by PCR. The PCR products were sequenced using the dideoxyterminal method. For the 16S rRNA gene fragment was obtained from 576 pb, 23 haplotypes, $h= 0.950$ e $\pi= 0.004$. The phylogenetic analysis grouped specimens with 99% to 100% of *bootstrap*. Genetic distances between and within populations varied from 0% to 1%. The sequencing of the COI gene resulted in a fragment of 672 bp, 23 haplotypes, $h= 0.940$ e $\pi= 0.009$. The AMOVA indicated that most of the molecular variation (64%) arises between groups. The fixation index was highly significant ($F_{ST}= 0.707$, $P < 0.00001$). The phylogenetic analysis indicated that the specimens represent a monophyletic group. Genetic distances between populations varied from 0% to 2%, and were 0–1% within populations. For the Control Region was obtained 1040 pb, 41 haplotypes, $h= 0.978$ e $\pi= 0.009$. The neutrality tests (D and F_s) were significant ($P < 0.05$) for most of the populations analyzed. The AMOVA indicated that most of the molecular variation (72%) arises between groups. The fixation index was highly significant ($F_{ST} = 0.707$, $P < 0.00001$). The phylogenetic analyses indicated that the specimens represented a monophyletic group. Genetic distances between populations varied from 0.8% to 1.9%, and $< 0.5\%$ within populations. The microsatellite primers amplified 104 alleles. The expected heterozygosity ranged 0.362 - 0.494 and observed heterozygosity ranged 0.438 - 0.510. The coefficient of inbreeding (F_{IS}) showed an excess of heterozygotes (negative value f) for all loci analyzed ($P < 0.05$). The AMOVA indicated that most of the molecular variation (89%) arises within populations. The F_{ST} was 0.229 with highly significant p (<0.00001). The genetic distance between populations showed rates of variation of 0.009 (Mearim/Pindaré) to 0.580 (Parnaíba/Itapecuru). The degree of genetic differentiation found among the stocks of *P. nattereri* indicates the need for the development of independent management plans for the different river basins in order to preserve the genetic variability of their populations.

Keywords: Variability, Maranhão, Management, Conservation.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Considerações gerais sobre a espécie <i>Pygocentrus nattereri</i>	14
2.1.1. Aspectos taxonômicos.....	14
2.1.2. Morfologia e Biologia.....	14
2.1.3. Distribuição e Importância econômica.....	15
2.1.4. Variabilidade genética em <i>Pygocentrus</i>	16
2.2. Marcadores Moleculares.....	17
2.2.1. DNA mitocondrial: rRNA 16S, COI e Região Controle.....	17
2.2.2. DNA nuclear: Microssatélites.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Geral.....	21
3.2. Específicos.....	21
3.2.1. DNA mitocondrial.....	21
3.2.2. Locos Microssatélites.....	21
4. MATERIAL E METÓDOS.....	22
4.1. Locais de coletas e Obtenção das amostras	22
4.2. Extração, Visualização e Diluição do DNA genômico.....	24
4.3. Amplificação e Sequenciamento do mtDNA (rRNA 16S, COI e Região Controle).....	25
4.4. Amplificação e Genotipagem dos Locos Microssatélites.....	26
4.5. Análise de Dados: rRNA 16S, COI e Região Controle.....	27
4.6. Análise de Dados: Locos Microssatélites.....	28
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Gene rRNA 16S.....	30
5.1.1. Análise do fragmento e Diversidade genética.....	30
5.1.2. Análises filogenéticas e Distância genética.....	31
5.2. Gene Citocromo Oxidase I (COI).....	33
5.2.1. Análise do fragmento e Diversidade genética.....	33
5.2.2. Estrutura populacional e Análise Molecular de Variância.....	35
5.2.3. Análises filogenéticas e Distância genética.....	35
5.2.4. Identificação dos espécimes no BOLD System (<i>The Barcode of Life Data System</i>).....	37
5.3. Região controle.....	38
5.3.1. Análise do fragmento, Diversidade genética e Testes de neutralidade.....	38
5.3.2. Estrutura populacional e Análise Molecular de Variância.....	41
5.3.3. Análises filogenéticas e Distância genética.....	41
5.4. Locos Microssatélites.....	43

5.4.1. Diversidade genética.....	43
5.4.2. Diferenciação genética e Estruturação populacional.....	45
5.4.3. Distância genética e Detecção de <i>locos outlier</i>	46
6. DISCUSSÃO.....	48
6.1. Gene rRNA 16S.....	48
6.2. Gene Citocromo Oxidase I (COI).....	50
6.3. Região Controle.....	52
6.4. Locus Microssatélites.....	55
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS.....	59
9. ANEXOS.....	69
Anexo I. Protocolo de extração de DNA com Fenol-Clorofórmio de Sambrook & Russel (2001) (adaptado para microtubos de 1,5 mL).....	70
Anexo II. Artigo científico aceito na revista Brazilian Journal of Biology (B1) - BJB – 002/2014.....	71

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Espécimes de <i>P. nattereri</i> obtidos em bacias hidrográficas no estado do Maranhão.....	23
Tabela 2. Sequências e referências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais.....	25
Tabela 3. Descrição dos ciclos de cada região mitocondrial amplificada na PCR.....	25
Tabela 4. Caracterização dos oito locos de microssatélites analisados para a espécie <i>P. nattereri</i>	27
Tabela 5. Sequências obtidas do banco de dados GenBank.....	29
Tabela 6. Níveis de diversidade genética nas populações de <i>P. nattereri</i> com base em sequências do gene rRNA 16S.....	30
Tabela 7. Distribuição dos 23 haplótipos encontrados para as populações de <i>P. nattereri</i> em função das localidades e com base no gene rRNA 16S.....	31
Tabela 8. Percentual médio de divergência nucleotídica em populações de <i>P. nattereri</i> com base nos parâmetros da distância <i>p</i> (abaixo do diagonal) e Tamura & Nei (acima do diagonal).....	33
Tabela 9. Níveis de diversidade genética nas populações de <i>P. nattereri</i> com base em sequências do gene COI.....	34
Tabela 10. Distribuição dos 23 haplótipos encontrados para as populações de <i>P. nattereri</i> em função das localidades e com base no gene COI.....	34
Tabela 11. Resultados da AMOVA com base no gene COI, considerando as localidades amostradas de <i>P. nattereri</i> em dois grupos: Itapecuru/Parnaíba e Mearim/Pindaré.....	35
Tabela 12. Percentual médio de divergência nucleotídica em populações de <i>P. nattereri</i> com base nos parâmetros da distância <i>p</i> (abaixo do diagonal) e Kimura 2-parameter (acima do diagonal).....	37
Tabela 13. Níveis de diversidade genética e testes de neutralidade para as populações de <i>P. nattereri</i> com base na Região Controle.....	39
Tabela 14. Distribuição dos 41 haplótipos encontrados para as populações de <i>P. nattereri</i> em função das localidades e com base na Região Controle.....	39
Tabela 15. Testes de neutralidade para as populações de <i>P. nattereri</i> com base na Região Controle do mtDNA.....	40
Tabela 16. Resultados da AMOVA com base na Região Controle, considerando as localidades amostradas de <i>P. nattereri</i> em dois grupos: Itapecuru/Parnaíba e Mearim/Pindaré.....	41
Tabela 17. Percentual médio de divergência nucleotídica em populações	

de <i>P. nattereri</i> com base nos parâmetros da distância p (abaixo do diagonal) e Tamura & Nei (acima do diagonal).....	43
Tabela 18. Índices de diversidade alélica em populações de <i>P. nattereri</i> em bacias hidrográficas maranhenses com base em oito locos microssatélites.....	44
Tabela 19. Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para os oito locos microssatélites analisados nas populações de <i>P. nattereri</i>	44
Tabela 20. Conteúdo de Informação de Polimorfismo, frequência de alelos nulos e riqueza alélica com base em oito locos microssatélites analisados nas populações de <i>P. nattereri</i>	45
Tabela 21. Índices de diversidade gênica em populações de <i>P. nattereri</i> em bacias hidrográficas maranhenses com base em oito locos microssatélites.....	45
Tabela 22. Valores obtidos para os índices da Estatística- F e Diferenciação genética em populações de <i>P. nattereri</i> com base em oito locos microssatélites.....	46
Tabela 23. Resultados da AMOVA para as quatro populações de <i>P. nattereri</i> com base em oito locos microssatélites, considerando cada localidade como um único grupo.....	46
Tabela 24. Matriz de Distância genética (D_a) abaixo do diagonal e Similaridade genética (D_i) acima do diagonal entre as populações de <i>P. nattereri</i> com base em oito locos microssatélites.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Espécie <i>Pygocentrus nattereri</i> Kner (1860).....	15
Figura 2. DNA mitocondrial de peixes com a localização em destaque do gene rRNA 16S, COI e Região Controle, utilizados no presente estudo.....	18
Figura 3. Localização das bacias hidrográficas onde foram obtidos os espécimes de <i>P. nattereri</i>	24
Figura 4. Árvore filogenética pelo critério de Neighbor-Joining com base no modelo de Tamura (1992) e no gene rRNA 16S do mtDNA. Os números acima do ramo da esquerda para direita indicam os valores de <i>bootstrap</i> para Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining.....	32
Figura 5. Árvore filogenética pelo critério de Neighbor-Joining com base no modelo de Tamura (1992) e no gene COI do mtDNA. Os números acima do ramo da esquerda para direita indicam os valores de <i>bootstrap</i> para Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining.....	36
Figura 6. Identificação (status específico) dos espécimes de acordo com a porcentagem de similaridade das sequências de COI no BOLD Systems v.3.....	38
Figura 7. Árvore filogenética pelo critério de Neighbor-Joining com base no modelo de Tamura (1992) e na Região Controle do mtDNA. Os números acima do ramo da esquerda para direita indicam os valores de <i>bootstrap</i> para Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining.....	42
Figura 8. Estimativa <i>a priori</i> da formação de possíveis agrupamentos populacionais, pela análise implementada no Programa BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure v 6.0) mostrando um total de três grupos ou <i>clusters</i>	43
Figura 9. Dendograma de Neighbour-Joining (NJ) para as populações de <i>P. nattereri</i> com base em oito locos microssatélites.....	47

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Pygocentrus nattereri* Kner (1860) popularmente conhecida como piranha vermelha, pertence à ordem Characiformes e subfamília Serrasalminae. Apresenta importância na pesca de subsistência e comercial, sendo bastante explorada ao longo de toda a sua distribuição geográfica. Apesar do seu potencial econômico, poucos estudos taxonômicos e moleculares têm sido realizados com esta espécie.

A diversidade genética dos recursos pesqueiros é de suma importância para a composição da biodiversidade. No entanto, as ações voltadas para a conservação dos recursos aquáticos estão mais relacionadas ao desaparecimento de uma espécie do que a perda da sua variabilidade genética. A perda da variabilidade genética pode comprometer a sobrevivência de uma espécie a médio ou longo prazo, pois compromete a habilidade da mesma se adaptar as mudanças que ocorrem constantemente no ambiente.

A utilização de marcadores moleculares tem permitido avanços no conhecimento da estrutura genética de estoques naturais e cultivados de peixes e a preservação do patrimônio genético existente nas espécies. Assim, o sequenciamento de regiões do genoma mitocondrial e nuclear, têm sido eficientes para fornecer informações que visam avaliar e diagnosticar geneticamente grande parte da biodiversidade de peixes, requisitos essenciais no desenvolvimento de planos de manejo e preservação, pois a ausência destas informações, associadas à carência de dados ecológicos e comportamentais pode comprometer a viabilidade de programas dessa natureza.

Apesar da importância econômica e nutricional de *P. nattereri*, estudos sobre a estrutura genética de suas populações em bacias hidrográficas do Nordeste são bastante reduzidos, e inexistentes em bacias do estado Maranhão. Portanto, este estudo teve como objetivo geral investigar os níveis de variabilidade e estruturação genética de populações de *P. nattereri* em bacias hidrográficas do estado do Maranhão, com base em sequências do DNA mitocondrial (rRNA 16S, COI e Região Controle) e nuclear (Microsatélites).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais sobre a espécie *Pygocentrus nattereri*

2.1.1. Aspectos taxonômicos

Piranhas são peixes de água doce neotropicais que apresentam os mais variados hábitos predatórios. Pertencem a ordem Characiformes que agrupa cerca de 10 famílias, 240 gêneros, 1460 espécies (SANTOS et al., 2004; CALCAGNOTTO et al., 2005) e subfamília Serrasalminae incluindo 80 espécies e 15 gêneros (SANTANA et al., 2011). São peixes dominantes em ambientes de água doce e ocorrem somente na África e nas Américas, desde o sudoeste dos Estados Unidos, estendendo-se pelo México, América Central e América do Sul (CALCAGNOTTO et al., 2005). Neste continente estão presentes em todas as bacias hidrográficas (OYAKAWA et al., 2006).

Do ponto de vista taxonômico e filogenético, as piranhas fazem parte de quatro gêneros da subfamília Serrasalminae: *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus* ((MACHADO-ALLISON, 1985; CIONE et al., 2009). O gênero *Pygocentrus* inclui três espécies identificadas como *P. piraya* (CUVIER, 1819) e *P. cariba* (MACHADO-ALLISON & FINK, 1992) presentes na Colômbia e Venezuela e *P. nattereri* (KNER, 1860) de ampla distribuição nos rios sul americanos (HUBERT et al., 2007). As espécies do gênero *Pygocentrus* são reconhecíveis pela forma convexa da sua cabeça e maxilar inferior maciço (QUEIROZ & MAGURRAN, 2002). A taxonomia dos serrasalmineos apresentam vários aspectos controversos, com discordância entre os autores quanto à sua posição sistemática (SANTANA et al., 2011).

2.1.2. Morfologia e Biologia

A piranha vermelha, *Pygocentrus nattereri* Kner (1860) possui corpo ovalado, curto e alto, perfil convexo, porte médio até 25 cm, com coloração predominantemente cinza-prateada e escurecida no dorso. As regiões peitoral e ventral, assim como a nadadeira anal, são avermelhadas (Figura 1), tornando-se arroxeadas no período de maturação sexual. Possuem dentes resistentes, aguçados, fortes e dilacerantes que denunciam seu regime alimentar, carnívoro e voraz (SOARES, 2005; SANTOS et al., 2006).

A dieta de *P. nattereri* é composta principalmente por peixes, artrópodes, moluscos, como também, outros invertebrados, peixes doentes e feridos e cadáveres. Apresenta desova parcelada, tamanho médio da primeira maturação sexual em torno de 13 cm nos machos e 15 cm nas fêmeas, ovos aderentes e postura sobre plantas submersas (SANTOS et al., 2006). Apesar de sua importância comercial, *P. nattereri* proporciona impactos ecológicos, tais como, predação de comunidades autóctones e redução da biodiversidade nativa (BERH & SIGNOR, 2008). No entanto, segundo Freeman et al. (2007), esta espécie possui um papel ecológico importante no equilíbrio do ecossistema por ser um dos predadores mais representativos no controle populacional de outras espécies de peixes.



Foto: Almeida, C. G.

Figura 1. Espécie *Pygocentrus nattereri* Kner (1860).

2.1.3. Distribuição e Importância econômica

Segundo Queiroz et al. (2010), a área de distribuição onde *P. nattereri* é nativa, inclui várias bacias hidrográficas da América do Sul, entre elas destacam-se as bacias dos rios Amazonas, Paraguai, Paraná, Madeira, Xingu, bacia dos rios costeiros do Nordeste do Brasil e outras. Esta espécie apresenta importância na pesca de subsistência e comercial, sendo bastante explorada ao longo de toda a sua distribuição. Por ser uma espécie muito comum, é bastante fácil de ser capturada por pescadores profissionais ou amadores. Sua elevada

abundância, ampla distribuição e vasta musculatura viabilizam a sua utilização na alimentação humana, na forma de caldos e de filetagem para sashimis (BARROS et al., 2010).

2.1.4. Variabilidade genética em *Pygocentrus*

A variabilidade genética é uma condição necessária para ocorrência das mudanças evolutivas. Novas variações são introduzidas nas populações pela ocorrência de mutações, deriva genética, seleção ou como resultado do fluxo gênico. A presença da variabilidade genética herdável em características adaptativas fornece flexibilidade fenotípica a novas mudanças ambientais, tais como introdução de um predador ou repentina contaminação com patógeno ou poluente (ALMEIDA, 2002).

Estudar variabilidade genética de populações só é possível devido ao avanço de marcadores moleculares (BENITES, 2008). Dentre as técnicas moleculares empregadas em estudos filogeográficos e populacionais, as mais utilizadas, são as de sequenciamento de fragmentos do DNA mitocondrial, como a região Região Controle (THUESEN et al., 2008) e a técnica de microssatélites (KEENEY et al., 2005). Segundo Terencio (2009), o entendimento da variabilidade e estrutura genética populacional de uma dada espécie é um passo importante, pois permite conhecer as diferenças genéticas geradas por processos vicariantes e suas relações com as diferenças adaptativas das populações, evitando dessa forma, efeitos adversos na ictiofauna.

Com base em segmentos do DNA mitocondrial (12S, rRNA 16S, Região Controle) alguns trabalhos têm relatado a problemática relação filogenética entre espécies do gênero *Pygocentrus* (CALCAGNOTTO et al., 2005; FREEMAN et al., 2007; HUBERT et al., 2007; ORTÍ et al., 2008) e evidenciado processos de estruturação populacional para indivíduos da espécie *P. nattereri* (TORRICO, 2004). Devido sua grande aplicabilidade em peixes, locos de microssatélites têm sido isolados e caracterizados para espécies da subfamília Serrasalminae, entre elas, *P. nattereri* (HAMOY et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2012; HAMOY & SANTOS, 2012; SANTANA et al., 2012) e contribuindo no esclarecimento da variabilidade e estrutura genética populacional desta espécie.

2.2. Marcadores Moleculares

2.2.1. DNA mitocondrial: rRNA 16S, COI e Região Controle

O DNA mitocondrial (mtDNA) animal é constituído de uma molécula pequena de fita dupla circular que codifica aproximadamente 5% de toda maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria (NAHUM, 2001). Seu tamanho é de aproximadamente 16.500 pares de base (pb), onde são descritos 37 genes, dos quais 13 codificam proteínas, 2 codificam RNAs ribossomais e 22 codificam RNAs transportadores (MEYER, 1993) (Figura 2). A molécula do mtDNA presente em cópias múltiplas por célula (102-140) é de herança materna, replica sem recombinação e evolui mais rapidamente que o genoma nuclear (AVISE et al., 1994; SACCONI et al., 2000).

O DNA mitocondrial vem sendo utilizado para aferir o grau de diversidade genética das espécies e estimar a variabilidade genética entre populações. Isto se deve a algumas vantagens, como, a facilidade em ser isolado, tamanho reduzido, herança uniparental, ausência de recombinação e elevada taxa de mutação (AVISE et al., 1994). Estudos dessa natureza são amplamente realizados para caracterização genética e avaliação da estrutura dos estoques de peixes em várias regiões do mundo (ORTÍ et al., 2008; IERVOLINO et al., 2010; TERCENIO et al., 2012; CHENG et al., 2012; BORBA et al., 2013; TERCENIO et al., 2013; PEREIRA et al., 2013).

O gene rRNA 16S (Figura 2) é bastante conservado, apresenta evolução lenta (PALUMBI et al., 1996) e tem se mostrado como um bom marcador na diferenciação de peixes, como também em estudos comparativos intergenéricos e interespecíficos (FARIAS et al., 2000; SANTOS et al., 2003; CALCAGNOTTO et al., 2005; FRAGA et al., 2007).

Outra ferramenta molecular bastante promissora tem sido o DNA *barcode* proposta por Hebert et al. (2003). O DNA *barcode* consiste em um segmento do DNA mitocondrial equivalente a 680 pb do gene Citocromo Oxidase I (COI) (Figura 2). Esse fragmento tem se mostrado eficaz em identificar espécies de aves, borboletas, peixes, moscas e muitos outros grupos de animais (HEBERT et al., 2003a; HEBERT et al., 2003b; HEBERT et al., 2004a; HEBERT et al., 2004b; WARD et al., 2005; IVANOVA et al., 2007;

HUBERT et al., 2008). A efetividade do sistema *barcode* foi demonstrada pela identificação de várias espécies de peixes marinhos e de água doce com uma taxa de sucesso de mais de 90% (PEREIRA et al., 2013).

Dentre os genes mitocondriais, a Região Controle, também conhecida como D-Loop (Figura 2) é responsável pelos processos de replicação e transcrição do DNA mitocondrial. Esta região é a mais utilizada em estudos populacionais, possuindo em torno de 1.100 pb e em peixes localiza-se entre as regiões codificadoras de dois RNAs transportadores (tRNA), o tRNA da prolina e o tRNA da fenilalanina. Estima-se que a sua taxa de evolução é de 2 a 5 vezes maior comparada aos demais genes mitocondriais codificadores de proteínas. Tais características também dão a este segmento genômico um grande destaque como ferramenta em estudos de estruturação genética e evolutivos (AVISE, 1986; MEYER, 1993).

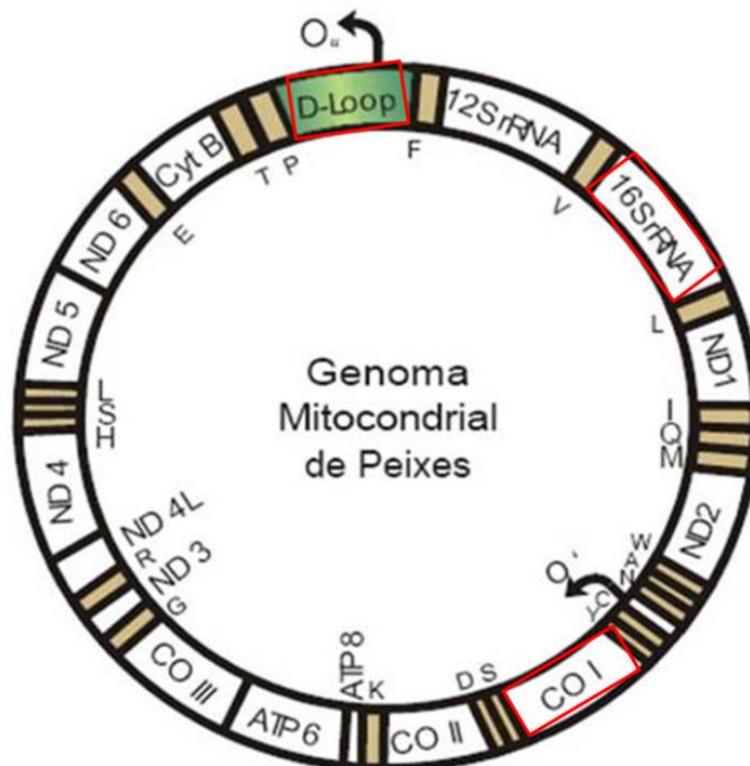


Figura 2. DNA mitocondrial de peixes com a localização do gene rRNA 16S, COI e Região Controle (indicado pelas setas), utilizados no presente estudo (modificado por Meyer, 1993).

2.2.2. DNA nuclear: Microssatélites

Os marcadores Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são regiões encontradas ao longo do DNA nuclear (nDNA). Consistem em pequenas sequências com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem (TAUTZ & RENZ, 1984; RAFALSKI et al., 1989) e formam a classe de marcadores moleculares mais polimórficos conhecidos atualmente. Os microssatélites estão predominantemente presentes nas regiões não codificantes do DNA, afetando, por exemplo, a organização da cromatina, recombinação e replicação do DNA, bem como a atividade dos genes (LI et al., 2002).

As SSR possuem altas taxas de mutação, numa faixa que varia entre 10^{-3} a 10^{-4} por locos (gametas/geração). Essa alta taxa de mutação se deve em grande parte a instabilidade que surgiu no mecanismo específico de mutação chamado de *slippage* (deslizamento) da DNA polimerase (TAUTZ & SCHLÖTTERER, 1994) seguida pela falta de reparação (LEVINSON & GUTMAN, 1987) ou durante o *crossing-over* desigual (WOLFF et al., 1989). Porém, é evidente que essas mutações que ocorrem nos microssatélites possuem um padrão bastante complexo que vem sendo estudado nos últimos anos (SCHLÖTTERER, 2004).

Devido à sua elevada taxa de mutação, os microssatélites se tornaram um excelente marcador para estudos populacionais (BARKER, 2002), parentesco (QUELLER et al., 1993), filogenia (ZHU et al., 2000), estrutura populacional (BOWCOCK et al., 1994), diversidade genética (KATTI et al., 2001), mapeamento genômico, ecologia molecular, conservação genética (ALLENDORF & LUIKART, 2007), identificação de locos envolvidos com doenças genéticas (BARKER, 2002), bem como desvendar a história biológica das populações (CHAMBERS & MACAVOY, 2000).

Segundo Chistiakov et al. (2006), os microssatélites são marcadores importantes para serem utilizados na aquicultura, sendo muito úteis para a caracterização de populações e mapeamento de características quantitativas economicamente importantes a partir da identificação dos genes responsáveis

por estas. Além disso, os microssatélites têm aplicação e utilização crescente em estudos de populações de peixes, com ênfase nos programas de conservação e manejo de espécies.

Apesar da potencialidade da aplicação dos marcadores microssatélites, ainda existem poucos estudos envolvendo peixes neotropicais. Os locos analisados no presente estudo objetivaram obter informações sobre os níveis de diversidade e estruturação genética em populações de *P. nattereri* e a partir desses dados, contribuir com subsídios para práticas de manejo mais adequadas e sustentáveis.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo principal do presente estudo foi determinar os níveis de variabilidade e estruturação genética em populações de *P. nattereri* em bacias hidrográficas do estado do Maranhão, com base em sequências do DNA mitocondrial (rRNA16S, COI e Região Controle) e nuclear (microssatélites).

3.2. Específicos

3.2.1. DNA mitocondrial

- ❖ Caracterizar geneticamente as populações através do gene rRNA 16S;
- ❖ Identificar os espécimes utilizando o gene Citocromo Oxidase I (COI) e comparar as sequências obtidas no BOLD System (The Barcode of Life Data System);
- ❖ Estimar os níveis de variabilidade e diferenciação genética intrapopulacional e interpopulacional nas bacias analisadas através da Região Controle;
- ❖ Obter filogenias moleculares atuantes baseadas nas sequências dos genes rRNA 16S, COI e Região Controle.

3.2.2. Locos Microssatélites

- ❖ Determinar a diversidade genética nas populações de *P. nattereri* analisadas;
- ❖ Identificar a ocorrência de diferenciação e estruturação genética entre as populações;
- ❖ Obter um dendograma baseado na distância genética entre as populações;
- ❖ Identificar possíveis *locos outlier* que possam estar relacionados com a adaptação local desta espécie.

4. MATERIAL E METÓDOS

4.1. Locais de coletas e Obtenção das amostras

O Estado do Maranhão, com uma superfície de 328.663 km² ou 3,86% do território nacional, localiza-se no Nordeste Ocidental do Brasil, entre as coordenadas 01°01' e 10°21'07" LS e 41°48'30" e 48°50'51" LW. As bacias hidrográficas que banham o estado pertencem, em sua maioria, à bacia do Norte e Nordeste, que ocupa uma área de 981.661 Km². O Maranhão representa uma área de transição entre o semiárido nordestino e a floresta amazônica abrigando uma rica hidrografia de rios perenes como Parnaíba, Itapecuru, Mearim e Pindaré (TEIXEIRA & SOUZA-FILHO, 2009; PIORSKI, 2010).

Os espécimes de *P. nattereri* foram coletados em quatro das principais bacias hidrográficas do Maranhão: Itapecuru, Parnaíba, Mearim e Pindaré (Tabela 1 e Figura 3). A bacia hidrográfica do rio Itapecuru (Figura 3) apresenta uma área de 52.972,1 Km² e nasce nas serras da Crureira, Itapecuru e Alpercatas até sua desembocadura na baía do arraial, a sul da ilha de São Luís/MA (ALCÂNTARA, 2004). A bacia hidrográfica do rio Parnaíba (Figura 3) possui uma área de 342.988 Km² e nasce nos contrafortes da Chapada das Mangabeiras, sul do Maranhão, percorrendo cerca de 1450 km até sua desembocadura no Oceano Atlântico (STELLA, 2011).

A bacia hidrográfica do rio Mearim (Figura 3) possui uma área de aproximadamente 96.000 Km² e nasce na confluência das serras Negra, Menina e Cruzeiras, e desemboca na Baía de São Marcos, na altura da ilha do Caranguejo (STELLA, 2011). O rio Pindaré (Figura 3), principal afluente do rio Mearim, nasce nas elevações que formam o divisor entre as bacias Mearim e Tocantins, com aproximadamente 686 Km², sendo navegável no trecho compreendido entre a sua foz no Km 41 do rio Mearim até a foz do rio Buriticupu no Km 456 (STELLA, 2011).

Os rios Pindaré, Mearim e Itapecuru formam um grupo de bacias genuinamente maranhenses com topografia similar desaguando no golfo maranhense (Mearim/Pindaré na Baía de São Marcos e Itapecuru na Baía de São José), sendo que em seus trechos inferiores Itapecuru e Mearim exibem

padrão diferenciado com formação de meandros e lagos exclusivo da bacia do Mearim. A evolução geomorfológica do Golfão Maranhense resultou de flutuações marinhas durante o Plioceno e Pleistoceno delineando o padrão atual de desembocadura dos rios da região central do Maranhão (AB'SÁBER, 1960).

A amostragem constitui-se de 60 exemplares, sendo 15 indivíduos para cada bacia hidrográfica analisada (Tabela 1). As coletas ocorreram entre os anos de 2007 a 2012, durante os meses de Fevereiro, Agosto, Setembro e Outubro (Tabela 1). Os espécimes de *P. nattereri* foram capturados por meio de redes de malhadeiras de vários milímetros, tarrafas e espinhéis e abatidos por imersão em água gelada (ASHLEY, 2007). O material coletado foi devidamente triado, etiquetado e conservado em gelo para posterior transporte ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular - GENBIMOL, no Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA.

A identificação taxonômica dos espécimes foi realizada através de literaturas específicas (BRITSKI et al., 1999; SANTOS et al., 2004; SOARES, 2005; SANTOS et al., 2006; PIORSKI et al., 2007) e confirmada por especialista do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de São Paulo - MZUSP (voucher - 104549/104550). Amostras de tecido muscular foram retiradas de cada exemplar e conservadas em álcool a 70% para fins de caracterização molecular. Os espécimes foram conservados em formol a 10% e encontram-se depositados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular - CESC/UEMA. Todas as coletas foram devidamente licenciadas pelo IBAMA (Licença nº. 02012.004159/2006).

Tabela 1. Espécimes de *P. nattereri* obtidos em bacias hidrográficas no estado do Maranhão.

Bacias hidrográficas	Nº amostral	Localidades	Coordenadas geográficas	Mês/Ano de coleta
Rio Itapecuru	15	Itapecuru-Mirim	03°31'39"S 44°24'19"W	08/2007
Rio Parnaíba	15	Coelho Neto	04°15'24"S 43°00'46"W	09/2011
Rio Mearim	15	Pedreiras	04°34'08"S 44°35'31"W	02/2011 02/2012
Rio Pindaré	15	Pindaré-Mirim	03°39'54"S 45°25'31"W	02/2011

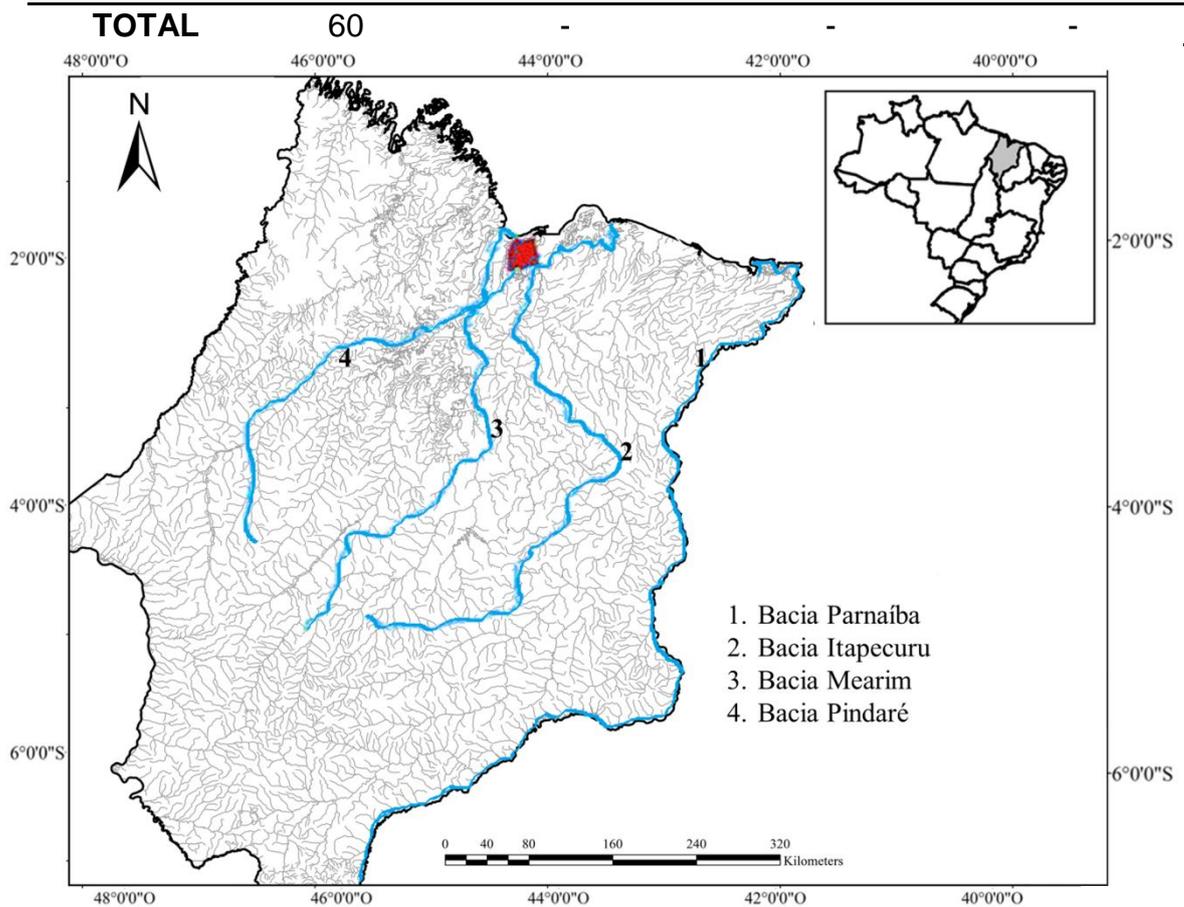


Figura 3. Localização das bacias hidrográficas maranhenses onde foram obtidos os espécimes de *P. nattereri*.

4.2. Extração, Visualização e Diluição do DNA genômico

O DNA total foi extraído utilizando o protocolo de fenol-clorofórmio de Sambrook & Russel (2001) com algumas modificações (Anexo I). A qualidade do DNA extraído foi verificada por meio de uma eletroforese em gel de Agarose a 1% (TBE 1X pH=8.0 e 0.1 mg/ml de Brometo de Ethidium) em uma proporção de 3 µl do corante Azul de Bromofenol (5ml de Glicerol, 1 ml de Azul de Bromofenol a 0.1%, 1 ml de Xilenocianol a 0.1%, 2 ml de EDTA a 0.5M) para 5 µl de DNA. As amostras foram conservadas em freezer a -20° C.

Para as análises dos locos de microssatélites foi necessária a quantificação e diluição do DNA extraído. Para a quantificação (ng/µl) foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Em seguida foi diluído para uma concentração de 50 ng/µl de DNA por amostra.

4.3. Amplificação e Sequenciamento do mtDNA (rRNA 16S, COI e Região Controle)

O isolamento e amplificação das regiões genômicas rRNA 16S, COI e Região Controle foi realizado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando-se primers específicos. As sequências dos primers estão descritos na tabela 2. A PCR foi feita em um volume final de 25 µl, com os seguintes reagentes: 4 µl de DNTPs (1.25 M) (nucleotídeos), 2.5 µl de Buffer (10X), 0.5 µl de solução de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de DNA (250 ng/µl), 0.25 µl de cada primer (200 ng/µl), 0.2 µl da enzima Taq polimerase (5U/µl) e 16.3 de H₂O purificada. Os parâmetros de amplificação de cada região mitocondrial encontram-se na tabela 3.

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

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

Primers	Sequências	Referências
rRNA 16S		
16SL1 (forward)	'5GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC3'	Palumbi et al. (1991)
16SH2 (reverse)	'5CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3'	
Citocromo Oxidase I		
COIF1 (forward)	'5TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3'	Ward et al. (2005)
COIR1 (reverse)	'5TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3'	
Região Controle		
D-LoopL1 (forward)	'5CCTAACTCCCAAAGCTAGGTATTC3'	Santa Brígida et al. (2007)
D-LoopH1 (reverse)	'5TGTTTATCACTGCTGRRTTCCCT3'	

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

Primers	Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
rRNA 16S	25	94°C/1 min	50°C/1 min	72°C/2 min
COI	35	94°C/30 s	54°C/30 s	72°C/1 min
Região Controle	35	94°C/30 s	50°C/1 min	72°C/2 min

4.4. Amplificação e Genotipagem dos Locos Microssatélites

A amplificação e genotipagem dos locos de microssatélites foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM, no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA. Foram utilizados oito locos desenvolvidos por Nascimento et al. (2012) (Tabela 4). Os fragmentos foram amplificados por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com um volume final de 10 μ l. A cada reação de PCR continha 1.5 μ l de DNA (50 ng/ μ l), 1.0 μ l de primer forward (0.4 μ M), 1.5 μ l de primer reverse (0.8 μ M), 1.0 μ l de primer M13 com fluorescência 6-FAM (0.4 μ M) e 5.0 μ l do PCR Master Mix (2x) (Fermentas), composto por Taq DNA polimerase (0.05 U), MgCl₂ (1.5 mM) e dNTPs (0.4 mM).

O protocolo de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 94°C por 1 min seguido de 25 ciclos a 94°C por 20s, o anelamento dos primers variou de 55 a 58°C por 20s (a temperatura específica de anelamento de cada primer encontra-se na tabela 4), 68°C por 20s, seguido de 20 ciclos para o anelamento do primer M13 (FAM) de 94°C a 30s, 53°C a 20 s, 68°C a 30s e uma extensão final de 72°C por 3 min. Os produtos amplificados foram corados com Front (500 μ l de TAE 1X, 500 μ l de Glicerol, 1.0 μ l de Azul de Bromofenol, 1.0 μ l de GelRed) e submetidos à eletroforese em gel de Agarose a 2% (TAE 1X pH= 8.0). Foi utilizando marcador de peso molecular de 100pb Ladder.

Os produtos da PCR (1.0 μ l) foram combinados com 0.3 μ l de LIZ e 8.7 μ l de Formamida Hi-Di e genotipados no sequenciador automático ABI Sequencer 3130xl (Applied Biosystems). Os fragmentos foram analisados utilizando o programa GeneMapper ver. 4.0 (Applied Biosystems).

Tabela 4. Caracterização dos oito locos de microssatélites analisados para a espécie *P. nattereri*.

Locos	Sequências dos primers* (5'- 3')	pb	Â	Ĥe	Ĥo	Ta (°C)
PN1	(F) CATTTCCTCACTAACCAAC (R) TGAATCCAAGACCAAGACT	237-249	6	0.554	0.529	55-58
PN2	(F) CTCTCACAAAACACTCTAC (R) TACATGGGACGGTTATTAC	245-259	5	0.562	0.667	55
PN3	(F) TGTCAAGCACTTATTTCTCC (R) GTTTTGCACTTTTCCCTTCA	229-244	4	0.455	0.529	58
PN5	(F) CAATAGGAGTGTAAGGAAC (R) CATGGAGGTGGTGAAG	209-229	14	0.779	0.794	55
PN6	(F) AACACACGAATAAGGGGAG (R) GGAGGAAGGAGAGCAGGA	152-190	15	0.771	0.657	55
PN7	(F) TGACCCCCATGACCCAGT (R) CGTCCTCCTTTTCTTTCCATT	224-248	10	0.759	0.824	55
PN11	(F) ATTTGTTAGTTTTGTGGA (R) AGTCTATTCTGTGACTCT	208-286	12	0.529	0.367	55
PN13	(F) GCAATCACCGCTACTAAAAG (R) ATAATACCCAGCCCTAATCAC	187-205	3	0.261	0.300	55-57

*Sequências dos pares de primers desenvolvidos por Nascimento et al. (2012). pb= pares de bases, Â= número de alelos, Ĥe= heterozigosidade esperada, Ĥo= heterozigosidade observada, Ta= temperatura de anelamento.

4.5. Análise de Dados: rRNA 16S, COI e Região Controle

As sequências foram editadas e alinhadas no CLUSTAL W 1.4 (THOMPSON et al., 1994) no software BIOEDIT 7.0 (HALL, 1999). Foram usadas como referência no alinhamento sequências de *P. nattereri* do banco de nucleotídeos GenBank (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI) (Tabela 5). As análises filogenéticas foram geradas no programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). Para a construção das árvores foi selecionado o modelo evolutivo de Tamura-3-parameter (T92+G+I) (TAMURA, 1992) e os métodos de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV) e Neighbor-Joining (NJ). O modelo evolutivo mais adequado foi determinado pelo teste de razão de verossimilhança no MEGA 5.0. A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* com 1.000 pseudoréplicas (FELSENSTEIN, 1985). Foram utilizadas como grupo externo sequências de *Metynnis* sp e *Metynnis hypsauchen* obtidas do GenBank (Tabela 5).

Os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica para cada população foram gerados no programa DNAsp 5.1 (LIBRADO & ROZAS, 2009). Informações quanto à neutralidade seletiva em populações naturais foram obtidas através dos testes de *D* (TAJIMA, 1989) e *F_S* (FU, 1997) (ARLEQUIN 3.5). A possível existência de diferenciação populacional e a significância da

variabilidade genética inter e intrapopulacional foram verificadas usando a Análise Molecular de Variância (AMOVA). O índice de Fixação (F_{ST}) foi obtido através de 1023 permutações aleatórias. Os testes de neutralidade, AMOVA e índices de fixação foram obtidos através do programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). Para a Região Controle também foi utilizado a análise de agrupamento Bayesiano descrito por Corander et al. (2013) no software BAPS 6.0 para identificar os possíveis agrupamentos populacionais.

A divergência nucleotídica entre e dentro das populações foram determinadas pela distância p não corrigida (rRNA 16S, COI e Região Controle) e pelos parâmetros corrigidos de Tamura & Nei (1993) (rRNA 16S e Região Controle) e Kimura 2-parameter (COI) no MEGA 5.0. A distância genética obtida para Região Controle foi baseada nos grupos encontrados na análise do BAPS. Foi feita a comparação das sequências nucleotídicas obtidas neste estudo com as sequências do banco de dados BOLD System v.3 (*The Barcode of Life Data System* - www.barcodinglife.org) (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007) para verificar a identificação correta dos espécimes de *P. nattereri*.

Tabela 5. Sequências obtidas do banco de dados GenBank.

Espécie	Código de acesso (GenBank) e Referência		
	rRNA 16S	COI	Região Controle
<i>P. nattereri</i>	DQ384717	NC015840	AF283953
	Hubert et al., 2007	Nakatani et al., 2011	Orti et al., 2008
	AY788074	AP012000	AP012000
	Calcagnotto et al., 2005	Nakatani et al., 2011	Nakatani et al., 2011
<i>Metynnis sp</i>	AF283933	-	AF283956
	Orti et al., 2008		Orti et al., 2008
<i>Metynnis hypsauchen</i>	AF283934	JQ667552	AF283957
	Orti et al., 2008	Khedkar et al., 2012	Orti et al., 2008

4.6. Análise de Dados: Locus Microssatélites

Para medir a diversidade genética a partir do número de alelos por locos (\hat{A}), heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e esperada (\hat{H}_e) foi utilizado o programa GENETIX 4.0 (BELKHIR et al., 2004). O número de alelos privados foi obtido através do software GDA 1.1 (LEWIS & ZAYKIN, 2000). O Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC), frequência de alelos nulos e o número de alelos efetivos por locus ($\hat{A}_e=1/(1-\hat{H}_e)$) foram calculados pelo programa

CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). A riqueza alélica por locus e o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram calculados utilizando o programa FSTAT 2.9 (GOUDET, 2001). Após o teste de EHW foi aplicada a correção de Bonferroni, que corrige as comparações múltiplas simultâneas, minimizando os erros do tipo I (RICE, 1989). O nível de significância utilizado foi de $\alpha = 0.05$.

Os níveis de diferenciação genética foram analisados segundo a estatística F de Wright (F_{IT} , F_{IS} e F_{ST} , WEIR & COCKEHAM, 1984) utilizando os softwares FSTAT 2.9 e ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). No entanto, dois índices de diferenciação genética foram mais abordados, o F_{ST} (WEIR & COCKEHAM, 1984) aplicado para o modelo de alelos infinitos (KIMURA & CROW, 1964) e o R_{ST} (SLATKIN, 1995) que assume o modelo de mutação escalonada (KIMURA & OHTA, 1978). Foram aplicados, ainda, os índices D_{ST} - Diferenciação absoluta (NEI, 1973) e G_{ST} - Diferenciação relativa (NEI, 1973). Estes estimadores foram ponderados utilizando o software FSTAT 2.9.

A AMOVA foi calculada utilizando o programa ARLEQUIN 3.5 e a significância do F_{ST} foi obtida através de 1023 permutações aleatórias. Uma matriz de distância (D_a) e similaridade genética (D_i) foi construída comparando as populações analisadas através do programa FSTAT 2.9. A partir desses dados foi obtido um dendrograma de Neighbor-Joining (NJ) utilizando o software GDA 1.1. Para detectar os possíveis locos que estejam sendo selecionados positivamente (*loci outlier*) foi utilizado o programa DETSELD 1.0 (VITALIS et al., 2003).

5. RESULTADOS

5.1. Gene rRNA 16S

5.1.1. Análise do fragmento e Diversidade genética

Foram obtidas sequências do gene rRNA 16S do DNA mitocondrial para 60 indivíduos de *P. nattereri* das quatro bacias estudadas. O tamanho do fragmento analisado foi de 576 pb, com uma composição nucleotídica média de 30.6% para adenina, 24.4% para citosina, 23.8% para guanina e 21.2% para timina. Foi observado um total de 23 haplótipos registrando uma diversidade haplotípica de 0.950 e nucleotídica de 0.004 (Tabela 6). Em relação aos sítios, 564 foram conservados, 12 foram polimórficos e 10 sítios informativos para parcimônia.

Quando as populações foram consideradas individualmente os valores de diversidade haplotípica variaram de 0.819 a 0.895, enquanto os índices de diversidade nucleotídica ficaram em torno de 0.002 a 0.004 (Tabela 6). Dos 23 haplótipos encontrados, sete (H1 a H7) foram exclusivos da bacia Itapecuru, sendo que quatro deles ocorreram uma única vez (H4, H5, H6 e H7). Seis haplótipos foram exclusivos da bacia Parnaíba (H8, H9, H10, H11, H12 e H13), sendo que o H12 e H13 tiveram frequência única. Cinco haplótipos foram compartilhados entre as bacias Mearim e Pindaré (H14, H15, H16, H20 e H21). Apenas três foram exclusivos para a bacia Mearim (H17, H18 e H19), tendo o H19 frequência única. Para a bacia Pindaré foi observado dois haplótipos únicos (H22 e H23) (Tabela 7). O haplótipo quinze (H15) mostrou-se mais frequente e ocorreu sete vezes nas populações Mearim e Pindaré (Tabela 7).

Tabela 6. Níveis de diversidade genética nas populações de *P. nattereri* com base em sequências do gene rRNA 16S.

Populações	N	NH	S	Índices de Diversidade Molecular	
				<i>H</i>	π
Rio Itapecuru	15	07	09	0.829	0.004
Rio Parnaíba	15	06	03	0.819	0.002
Rio Mearim	15	08	04	0.895	0.002
Rio Pindaré	15	07	05	0.848	0.002
Populações agrupadas	60	23	11	0.950	0.004

N= número amostral, NH= número de haplótipos, S= sítios polimórficos, *h*= diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica.

Tabela 7. Distribuição dos 23 haplótipos encontrados para as populações de *P. nattereri* em função das localidades e com base no gene rRNA 16S.

Haplótipos	Itapecuru	Parnaíba	Mearim	Pindaré	TOTAL
H1	02	-	-	-	02
H2	06	-	-	-	06
H3	03	-	-	-	03
H4	01	-	-	-	01
H5	01	-	-	-	01
H6	01	-	-	-	01
H7	01	-	-	-	01
H8	-	04	-	-	04
H9	-	05	-	-	05
H10	-	02	-	-	02
H11	-	02	-	-	02
H12	-	01	-	-	01
H13	-	01	-	-	01
H14	-	-	03	03	06
H15	-	-	02	05	07
H16	-	-	01	03	04
H17	-	-	02	-	02
H18	-	-	04	-	04
H19	-	-	01	-	01
H20	-	-	01	01	02
H21	-	-	01	01	02
H22	-	-	-	01	01
H23	-	-	-	01	01
TOTAL	15	15	15	15	60

5.1.2. Análises filogenéticas e Distância genética

A reconstrução filogenética baseada em três métodos distintos (Máxima Parcimônia - MP, Máxima Verossimilhança - MV e Neighbor-Joining - NJ) geraram topologias similares, agrupando fortemente os exemplares de *P. nattereri* com 99% de *bootstrap* para MP e 100% de *bootstrap* para as análises de MV e NJ, confirmando, portanto, a monofilia para os espécimes analisados (Figura 4). As topologias também sugeriram a formação de dois subclados, um formado exclusivamente por espécimes das bacias Itapecuru e Parnaíba, e outro, formado por todos os exemplares das bacias Mearim e Pindaré e alguns

indivíduos das bacias Itapecuru e Parnaíba (Figura 4). A matriz de distância genética com base no gene rRNA 16S revelou índices de diferenciação interpoblacional e intrapoblacional entre 0 a 1% (Tabela 8).

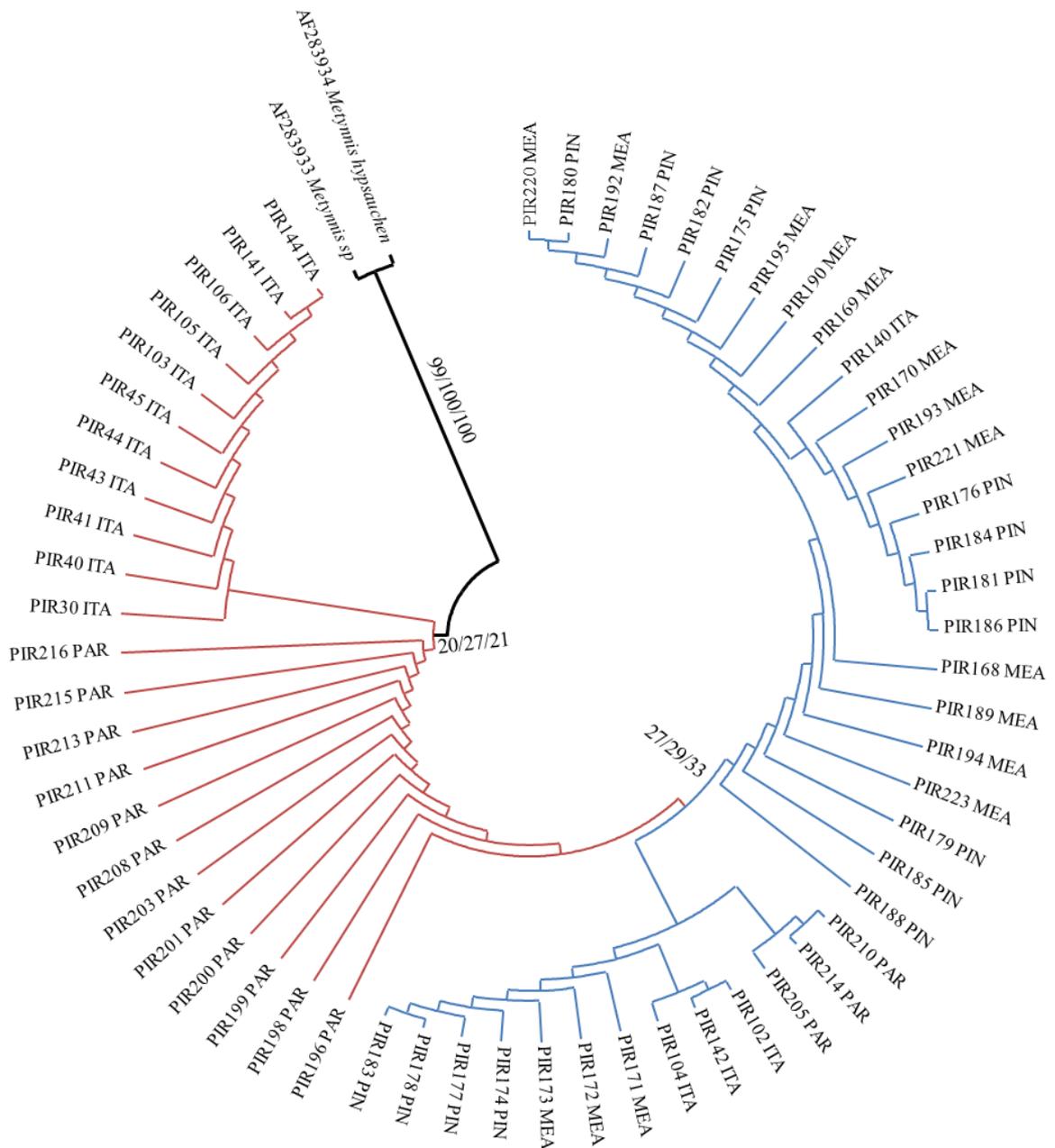


Figura 4. Árvore filogenética pelo critério de Neighbor-Joining com base no modelo de Tamura (1992) e no gene rRNA 16S do mtDNA. Os números acima do ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining. ITA= Itapecuru, MEA= Mearim, PIN= Pindaré e PAR= Parnaíba.

Tabela 8. Percentual médio de divergência nucleotídica em populações de *P. nattereri* com base nos parâmetros da distância p (abaixo do diagonal) e Tamura & Nei (acima do diagonal).

Populações	% Divergência Interpopulacional				% Divergência Intrapopulacional
	Rio Itapecuru	Rio Parnaíba	Rio Mearim	Rio Pindaré	
Rio Itapecuru		0	1	1	1*
Rio Parnaíba	1		1	1	0
Rio Mearim	1	1		1	0
Rio Pindaré	1	1	0		1

* Os índices de divergência intrapopulacional foram iguais para ambos os parâmetros (distância p e Tamura & Nei).

5.2. Gene Citocromo Oxidase I (COI)

5.2.1. Análise do fragmento e Diversidade genética

O sequenciamento do gene Citocromo Oxidase I (COI) do DNA mitocondrial de 60 indivíduos da espécie *P. nattereri* resultou em um fragmento de 672 pb com 655 sítios conservados, 17 polimórficos e 15 sítios informativos para parcimônia. A composição nucleotídica consistiu de 24.1% de adenina, 31.3% de citosina, 18.0% de guanina e 26.6% de timina. Dentre todas as sequências analisadas foram encontrados 23 haplótipos e valores de diversidade haplotípica e nucleotídica de $h= 0.940$ e $\pi= 0.009$, respectivamente, conforme mostra a Tabela 9. Quando as populações foram consideradas separadamente os valores de diversidade haplotípica variaram de 0.819 (Mearim) a 0.895 (Pindaré) (Tabela 9).

Dos 23 haplótipos encontrados, sete foram exclusivos para a bacia Itapecuru (H2, H3, H4, H5, H6, H8 e H9) sendo que seis destes ocorreram uma única vez (H2, H3, H4, H5, H6 e H9). A bacia Itapecuru ainda compartilhou dois haplótipos, o H1 com a bacia Pindaré, e o H7 com as bacias Mearim e Pindaré sendo este o mais frequente, ocorrendo nove vezes. Para a bacia Parnaíba foram obtidos sete haplótipos exclusivos (H10 a H16), sendo que apenas H11 e H16 tiveram frequência única. Cinco haplótipos foram compartilhados entre as bacias Mearim e Pindaré (H17, H19, H20, H21 e H22) e apenas o H18 foi único para bacia Mearim e o H23 para a bacia Pindaré (Tabelas 10).

Tabela 9. Níveis de diversidade genética nas populações de *P. nattereri* com base em sequências do gene COI.

Populações	N	NH	S	Índices de Diversidade Molecular	
				<i>h</i>	π
Rio Itapecuru	15	09	13	0.886	0.006
Rio Parnaíba	15	07	05	0.880	0.003
Rio Mearim	15	07	06	0.819	0.002
Rio Pindaré	15	08	13	0.895	0.004
Populações agrupadas	60	23	17	0.940	0.009

N= número amostral, NH= número de haplótipos, S= sítios polimórficos, *h*= diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica.

Tabela 10. Distribuição dos 23 haplótipos encontrados para as populações de *P. nattereri* em função das localidades e com base no gene COI.

Haplótipos	Itapecuru	Parnaíba	Mearim	Pindaré	TOTAL
H1	05	-	-	01	06
H2	01	-	-	-	01
H3	01	-	-	-	01
H4	01	-	-	-	01
H5	01	-	-	-	01
H6	01	-	-	-	01
H7	02	-	03	04	09
H8	02	-	-	-	02
H9	01	-	-	-	01
H10	-	02	-	-	02
H11	-	01	-	-	01
H12	-	04	-	-	04
H13	-	03	-	-	03
H14	-	02	-	-	02
H15	-	02	-	-	02
H16	-	01	-	-	01
H17	-	-	06	02	08
H18	-	-	01	-	01
H19	-	-	01	01	02
H20	-	-	01	01	02
H21	-	-	02	03	05
H22	-	-	01	02	03
H23	-	-	-	01	01
TOTAL	15	15	15	15	60

5.2.2. Estrutura populacional e Análise Molecular de Variância

A partir dos dados de presença e ausência de polimorfismo genético foi estimada a variabilidade entre os grupos, entre populações dentro dos grupos e dentro de populações através da Análise Molecular de Variância (AMOVA). Os padrões de diferenciação genética foram estimados considerando-se dois grupos: Itapecuru/Parnaíba e Mearim/Pindaré.

A AMOVA indicou que a maior parte da variação molecular - 64% - ocorre entre os grupos, enquanto 29% foram atribuídas a diferenças dentro das populações. A variação genética observada entre as populações dentro dos grupos foi de apenas 7% (Tabela 11).

A diferenciação genética entre as populações representada pelos valores de diferenças par-a-par, foi avaliada utilizando-se o índice de Fixação (F_{ST}). O F_{ST} foi de 0.707 com p altamente significativo (<0.00001) (Tabela 11). Estes resultados denotam forte estruturação genética entre as populações de *P. nattereri* analisadas.

Tabela 11. Resultados da AMOVA com base no gene COI, considerando as localidades amostradas de *P. nattereri* em dois grupos: Itapecuru-Parnaíba e Mearim-Pindaré.

Tipos de variação	Componentes de variação	% Total de variação	F_{ST}	p
Entre grupos	2.918	64	0.707	<0.00001
Entre populações dentro dos grupos	0.318	07		
Dentro de populações	1.342	29		

$P < 0.05$, indica diferença estatística significativa.

5.2.3. Análises filogenéticas e Distância genética

Os espécimes de *P. nattereri* agruparam-se fortemente em um único clado com 99% de *bootstrap* para MP e 100% de *bootstrap* para MV e NJ, confirmando o monofiletismo para os espécimes estudados (Figura 5). As filogenias sugerem ainda, a formação de duas linhagens evolutivas distintas: a primeira linhagem agrupou todos os espécimes da bacia Parnaíba com exemplares do rio Pindaré e Itapecuru. A segunda linhagem reuniu algumas amostras do rio Itapecuru e indivíduos das bacias Mearim e Pindaré (94%-M,

97%-MV e 96%-NJ) (Figura 5). Para o gene mitocondrial COI, a diferenciação entre as populações variou de 0 a 2%, no entanto, a variação observada dentro das populações ficou em torno de 0 a 1% (Tabela 12).

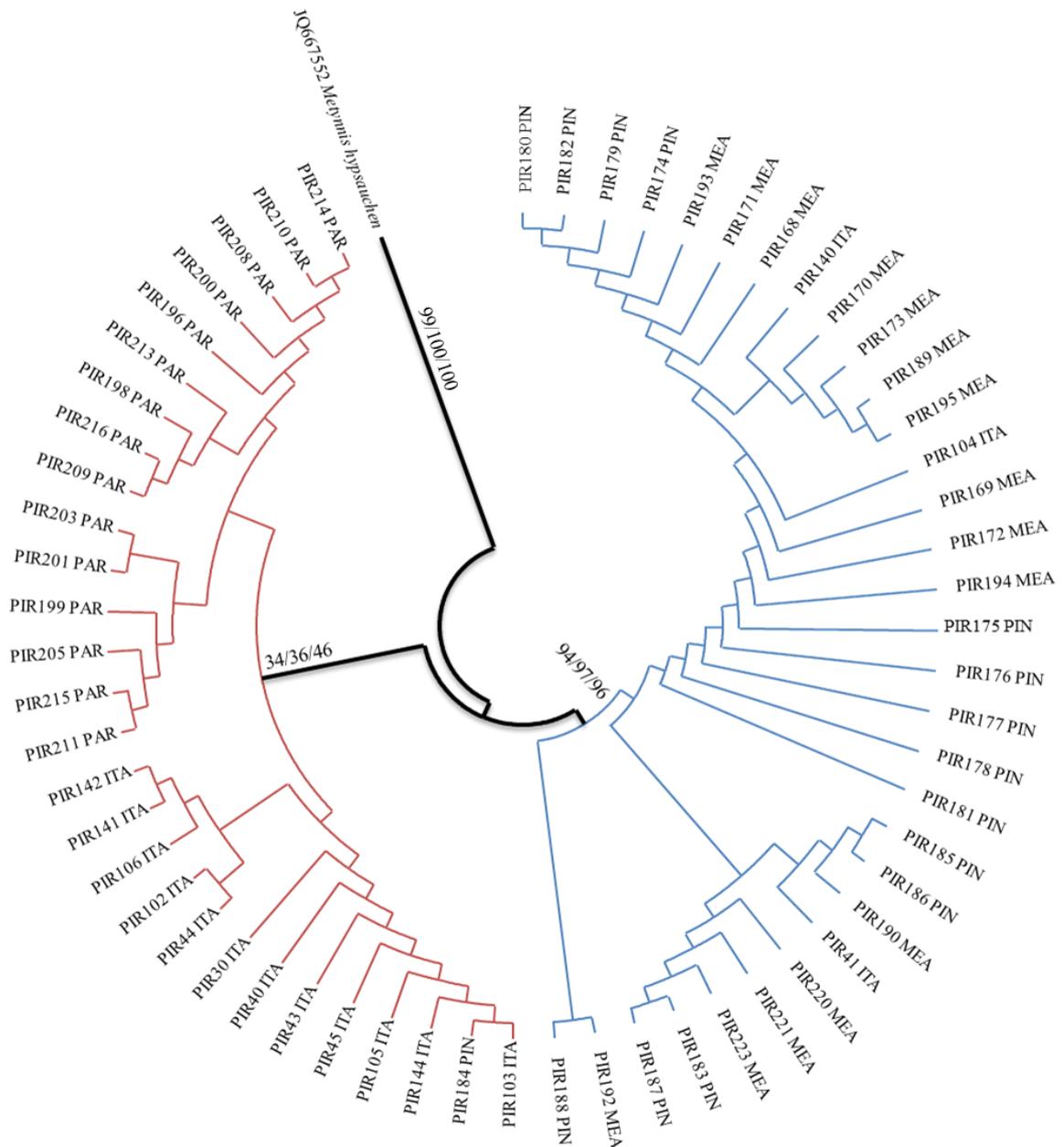


Figura 5. Árvore filogenética pelo critério de Neighbor-Joining com base no modelo de Tamura (1992) e no gene COI do mtDNA. Os números acima do ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining. ITA= Itapecuru, MEA= Mearim, PIN= Pindaré e PAR= Parnaíba.

Tabela 12. Percentual médio de divergência nucleotídica em populações de *P. nattereri* com base nos parâmetros da distância p (abaixo do diagonal) e Kimura 2-parameter (acima do diagonal).

Populações	% Divergência Interpopulacional				% Divergência Intrapopulacional
	Rio Itapecuru	Rio Parnaíba	Rio Mearim	Rio Pindaré	
Rio Itapecuru		0	2	1	1*
Rio Parnaíba	1		2	1	0
Rio Mearim	1	2		1	0
Rio Pindaré	1	2	0		0

* Os índices de divergência intrapopulacional foram iguais para ambos os parâmetros (distância p e Kimura 2-parameter).

5.2.4. Identificação dos espécimes no BOLD System (*The Barcode of Life Data System*)

Para verificar a identificação correta dos espécimes foi realizada a comparação das sequências nucleotídicas obtidas no presente trabalho com as sequências depositadas no banco de dados do BOLD (*The Barcode of Life Data System*). O BOLD é um banco de sequências do gene Citocromo Oxidase I (COI) e de informações associadas a estas, como dados taxonômicos e moleculares.

A porcentagem de identificação dos espécimes no BOLD System variou de 98.48% a 99.69% de similaridade com a espécie *P. nattereri* (Figura 6). A posição taxonômica obtida no BOLD para cada indivíduo foi confirmada com aquela descrita por Kner (1860):

PHYLUM Chordata

CLASS Actinopterygii

ORDER Characiformes

FAMILY Serrasalmidae

GENUS *Pygocentrus*

SPECIES *Pygocentrus nattereri*



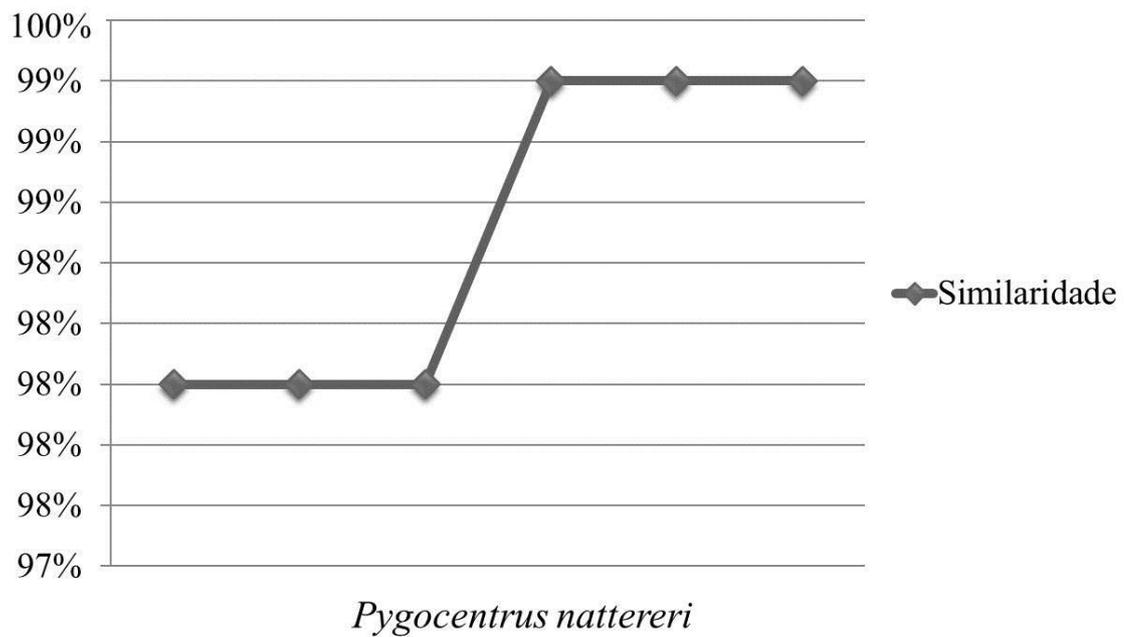


Figura 6. Identificação (status específico) dos espécimes de acordo com a porcentagem de similaridade das sequências de COI no BOLD Systems v.3.

5.3. Região controle

5.3.1. Análise do fragmento, Diversidade genética e Testes de neutralidade

A amplificação da Região Controle dos 60 espécimes de *P. nattereri* gerou 1040 pares de bases. A composição média das bases nucleotídicas foi de 29.8% de Timina, 23.4% de Citosina, 30.6% de Adenina e 16.2% de Guanina. Entre as sequências analisadas foram encontrados 33 sítios polimórficos, 1007 sítios conservados e 27 informativos para parcimônia. Analisando todas as populações foram registrados 41 haplótipos e diversidade haplótipica de $h=0.978$ e nucleotídica igual a $\pi=0.009$ (Tabela 13). Os espécimes das bacias Mearim, Itapecuru e Pindaré apresentaram altos índices de diversidade haplotípica como mostra a Tabela 13.

Dos 41 haplótipos encontrados, a bacia Itapecuru apresentou doze únicos (H1, H3 a H13) e um haplótipo (H2) compartilhado com a bacia Parnaíba, sendo este o mais frequente ocorrendo seis vezes nestas populações. Oito haplótipos foram exclusivos para Parnaíba (H14 a H21) e destes, sete foram únicos na população (H15 a H21). As bacias Mearim e Pindaré compartilharam cinco haplótipos (H22, H25, H26, H27 e H33). Para a bacia Mearim também

foram registrados oito haplótipos com frequência única (H23, H24, H28 a H32, H34) e para a bacia Pindaré foram obtidos sete haplótipos exclusivos (H35 a H41) e cinco destes foram únicos (H36, H37, H38, H39 e H41) (Tabela 14).

Tabela 13. Níveis de diversidade genética e testes de neutralidade para as populações de *P. nattereri* com base em sequências da Região Controle.

Populações	N	NH	S	Índices de Diversidade Molecular	
				<i>h</i>	π
Rio Itapecuru	15	13	18	0.971	0.005
Rio Parnaíba	15	09	14	0.876	0.005
Rio Mearim	15	13	09	0.981	0.002
Rio Pindaré	15	12	09	0.971	0.002
Populações agrupadas	60	41	33	0.978	0.009

N= número amostral, NH= número de haplótipos, S= sítios polimórficos, *h*= diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica.

Tabela 14. Distribuição dos 41 haplótipos encontrados para as populações de *P. nattereri* em função das localidades e com base na Região Controle.

Haplótipos	Itapecuru	Parnaíba	Mearim	Pindaré	TOTAL
H1	01	-	-	-	01
H2	03	03	-	-	06
H3	01	-	-	-	01
H4	01	-	-	-	01
H5	01	-	-	-	01
H6	01	-	-	-	01
H7	01	-	-	-	01
H8	01	-	-	-	01
H9	01	-	-	-	01
H10	01	-	-	-	01
H11	01	-	-	-	01
H12	01	-	-	-	01
H13	01	-	-	-	01
H14	-	05	-	-	05
H15	-	01	-	-	01
H16	-	01	-	-	01
H17	-	01	-	-	01
H18	-	01	-	-	01
H19	-	01	-	-	01
H20	-	01	-	-	01

Tabela 17. Continuação.

Hapl-21	-	01	-	-	01
Hapl-22	-	-	01	01	02
Hapl-23	-	-	01	-	01
Hapl-24	-	-	01	-	01
Hapl-25	-	-	02	01	03
Hapl-26	-	-	02	02	04
Hapl-27	-	-	01	01	02
Hapl-28	-	-	01	-	01
Hapl-29	-	-	01	-	01
Hapl-30	-	-	01	-	01
Hapl-31	-	-	01	-	01
Hapl-32	-	-	01	-	01
Hapl-33	-	-	01	01	02
Hapl-34	-	-	01	-	01
Hapl-35	-	-	-	02	02
Hapl-36	-	-	-	01	01
Hapl-37	-	-	-	01	01
Hapl-38	-	-	-	01	01
Hapl-39	-	-	-	01	01
Hapl-40	-	-	-	02	02
Hapl-41	-	-	-	01	01
TOTAL	15	15	15	15	60

Os testes de neutralidade de Tajima (D) e F_u (F_S) foram significativos para a maioria das populações (exceto rio Parnaíba - $F_S = -0.976$ e $p = 0.283$) quando analisadas em grupo ou separadamente, com $P < 0.05$, indicando que a hipótese do polimorfismo neutro de mutações pode ser rejeitada e sugerindo ainda que as populações dos rios Itapecuru, Mearim e Pindaré, provavelmente passaram por uma expansão populacional recente (Tabela 15).

Tabela 15. Testes de neutralidade para as populações de *P. nattereri* com base na Região Controle do mtDNA.

Populações	Teste D de Tajima	Teste F_S de F_u	P
Rio Itapecuru	-0.022	-6.072	0.001
Rio Parnaíba	0.840	-0.976	0.283
Rio Mearim	-0.008	-10.55	0.000
Rio Pindaré	-0.188	-8.503	0.000

$p =$ nível de significância de F_S .

5.3.2. Estrutura populacional e Análise Molecular de Variância

Os padrões de variabilidade genética encontrados dentro e entre as populações através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) foram estimados considerando-se três grupos com base nos *clusters* encontrados: Parnaíba, Itapecuru e Mearim-Pindaré. A AMOVA indicou que 72% da variação molecular ocorrem entre os grupos, enquanto 28% foram atribuídas a diferenças dentro das populações. O F_{ST} foi de 0.707 com p altamente significativo (<0.00001), indicando estruturação genética entre as populações analisadas (Tabela 16).

Tabela 16. Resultados da AMOVA com base na Região Controle, considerando as localidades amostradas de *P. nattereri* em três grupos: Parnaíba, Itapecuru e Mearim-Pindaré.

Tipos de variação	Componentes de variação	% Total de variação	F_{ST}	p
Entre grupos	4.932	72	0.707	<0.00001
Entre populações dentro dos grupos	-0.072	-1		
Dentro de populações	2.014	28		

$P < 0.05$, indica diferença estatística significativa.

5.3.3. Análises filogenéticas e Distância genética

As análises filogenéticas foram baseadas em três métodos diferentes (MP, MV e NJ) para estimar a topologia mais provável que pudesse refletir a história evolutiva de *P. nattereri* nas bacias estudadas. As topologias foram similares para ambos os métodos, agrupando os exemplares com 99% (MP) a 100% de *bootstrap* (MV e NJ) e confirmam o monofiletismo para os espécimes analisados (Figura 7). As abordagens filogenéticas também revelaram três possíveis grupos formados por exemplares da bacia Parnaíba (80%-MP, 85%-MV, 85%-NJ), amostras dos rios Parnaíba e Itapecuru (74%-MP, 69%-ML e 84%-NJ de *bootstrap*) e espécimes das bacias Itapecuru, Mearim e Pindaré (88%-MP, 92%-ML e 95%-NJ de *bootstrap*) (Figura 7).

Os agrupamentos populacionais gerados no BAPS, através de inferência bayesiana revelaram a formação de três grupos ou *clusters*, sendo que a maior distância encontrada foi entre o grupo do rio Parnaíba e o grupo

formado pelas amostras do Mearim-Pindaré com 1.9% de divergência. Entre o grupo do Parnaíba e Itapecuru foi observado a menor divergência (0.8%) (Figura 8 e Tabela 17). A diferenciação dentro das populações foi $< 0.5\%$ (Tabela 17).

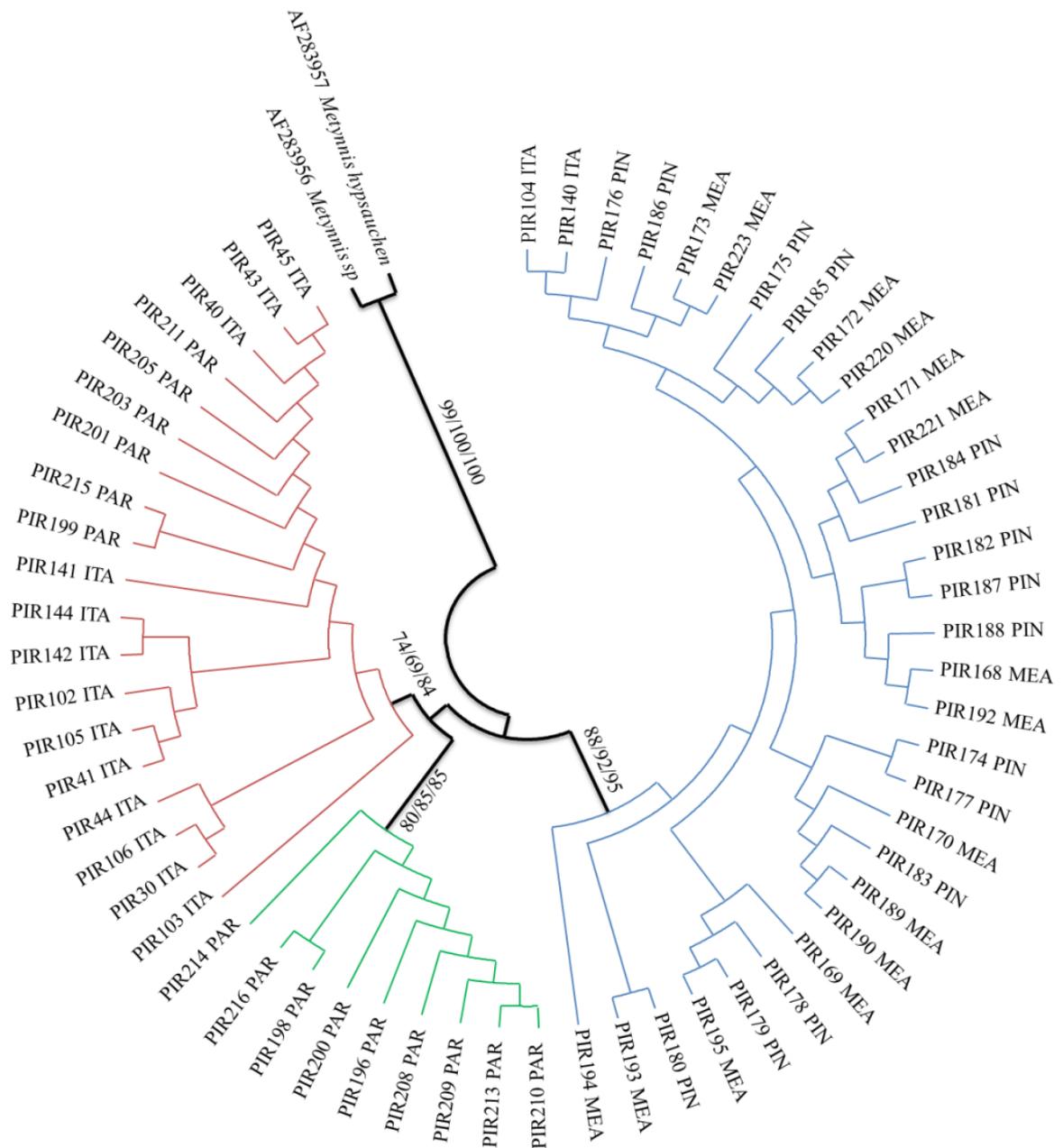


Figura 7. Árvore filogenética pelo critério de Neighbor-Joining com base no modelo de Tamura (1992) e na Região Controle do mtDNA. Os números acima do ramo da esquerda para direita indicam os valores de *bootstrap* para Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Neighbor-Joining. ITA= Itapecuru, MEA= Mearim, PIN= Pindaré e PAR= Parnaíba.

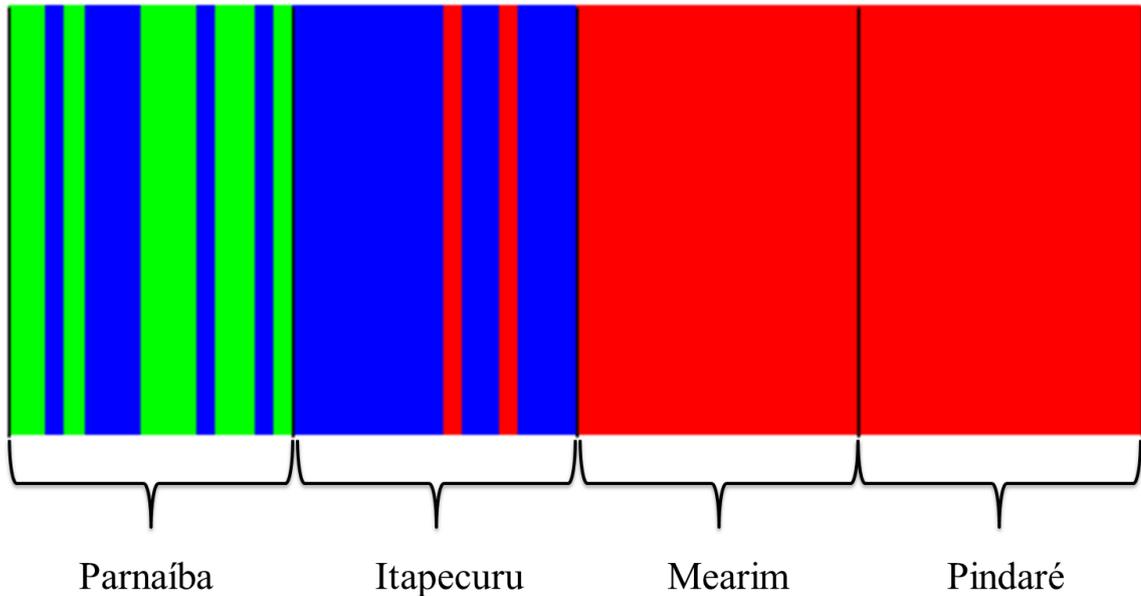


Figura 8. Estimativa *a priori* da formação de possíveis agrupamentos populacionais, pela análise implementada no Programa BAPS (*Bayesian Analysis of Population Structure* v 6.0) mostrando um total de três grupos ou *clusters*.

Tabela 17. Percentual médio de divergência nucleotídica em populações de *P. nattereri* com base nos parâmetros da distância p (abaixo do diagonal) e Tamura & Nei (acima do diagonal).

População	% Divergência Interpopulacional			% Divergência Intrapopulacional
	Itapecuru	Parnaíba	Mearim-Pindaré	
Itapecuru		0.8	1.5	0.2*
Parnaíba	0.8		1.9	0.3
Mearim-Pindaré	1.4	1.9		0.3

*Os índices de divergência intrapopulacional foram iguais para ambos os parâmetros (distância p e Tamura & Nei).

5.4. Locos Microsatélites

5.4.1. Diversidade genética

Os oito *primers* utilizados amplificaram 104 alelos em 48 espécimes de *P. nattereri*, sendo 12 indivíduos para cada bacia analisada (Tabela 18). O número de alelos por locos variou de 3 a 10 com média de 5.89 alelos. As análises também detectaram a ocorrência de 29 alelos privados nas populações (Tabela 21). A heterozigosidade esperada variou de 0.362 a 0.494 e a heterozigosidade observada variou de 0.438 a 0.510 (Tabela 18). Os índices de

endogamia (f) obtidos para bacias Itapecuru, Mearim e Pindaré, foram negativos, e indicam uma acentuada heterozigose nestas populações (Tabela 18).

Os locos PN2, PN3 e PN11 apresentaram desvio significativo para EHW ($P= 0.05$, correção de Bonferroni ≤ 0.006) (Tabela 19). O Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) variou de 0.223 (PN2) a 0.734 (PN7) com média de 0.414. Dois marcadores apresentaram-se altamente polimórficos (PN6 e PN7) com valores do PIC > 0.5 (Tabela 20) Os locos que demonstraram maior frequência de alelos nulos foram PN3, PN6 e PN11 (Tabela 20).

Os maiores valores de diversidade alélica foram observados para os locos PN5 (AR= 5.694) e PN7 (AR= 5.840) com o número total de 10 e 9 alelos, respectivamente. Os menores valores de diversidade alélica foram registrados para os locos PN1 (AR= 2.542) com 3 alelos e PN13 (AR= 2.637) com 4 alelos (Tabela 20). Os maiores índices de diversidade gênica também foram revelados para os locos PN5 (0.682) e PN7 (0.811) (Tabela 21).

Tabela 18. Índices de diversidade alélica em populações de *P. nattereri* em bacias hidrográficas maranhenses com base em oito locos microssatélites.

Populações	N	TNA	PNA	\hat{H}_e	\hat{H}_o	f
Itapecuru	12	24	4	0.389	0.510	-0.271
Parnaíba	12	34	19	0.494	0.482	0.067
Mearim	12	22	4	0.362	0.438	-0.168
Pindaré	12	24	2	0.368	0.500	-0.320
TOTAL	48	104	29	-	-	

N= número amostral, TNA= número total de alelos, PNA= número de alelos privados, \hat{H}_e = heteroziguidade esperada, \hat{H}_o = heteroziguidade observada, f = índice de endogamia.

Tabela 19. Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para os oito locos microssatélites analisados nas populações de *P. nattereri*.

Locos	Populações			
	Itapecuru	Parnaíba	Mearim	Pindaré
PN1	0.261	0.917	0.863	0.501
PN2	0.000*	0.816	0.000*	0.800
PN3	0.018	0.006*	0.000*	0.000*
PN5	0.048	0.013	0.802	0.254
PN6	0.116	0.270	0.238	0.177
PN7	0.389	0.287	0.800	0.286
PN11	0.088	0.000*	0.095	0.513
PN13	0.164	0.104	0.026	0.019

*Alelos que apresentaram desvio para EHW ($P= 0.05$, correção de Bonferroni ≤ 0.006).

Tabela 20. Conteúdo de Informação de Polimorfismo, frequência de alelos nulos e riqueza alélica com base em oito locos microssatélites analisados nas populações de *P. nattereri*.

Locos	Ā	PIC	<i>F</i> (null)	AR
PN1	3	0.318	-0.078	2.542
PN2	8	0.223	-0.058	3.175
PN3	7	0.469	0.312	4.041
PN5	10	0.497	-0.054	5.694
PN6	7	0.631	0.060	4.542
PN7	9	0.734	-0.019	5.840
PN11	5	0.443	0.482	3.656
PN13	4	0.415	-0.242	2.637
Média	5.89	0.414	-	-

Ā= número de alelos por locus, PIC= Conteúdo de Informação de Polimorfismo, *F*(null)= frequência de alelos nulos e AR= riqueza alélica.

Tabela 21. Índices de diversidade gênica em populações de *P. nattereri* em bacias hidrográficas maranhenses com base em oito locos microssatélites.

Locos	Populações			
	Itapecuru	Parnaíba	Mearim	Pindaré
PN1	0.227	0.538	0.386	0.299
PN2	0.083	0.379	0.083	0.356
PN3	0.500	0.314	0.242	0.000
PN5	0.443	0.682	0.356	0.443
PN6	0.606	0.245	0.598	0.477
PN7	0.663	0.811	0.667	0.652
PN11	0.159	0.591	0.163	0.303
PN13	0.530	0.576	0.500	0.500

5.4.2. Diferenciação genética e Estruturação populacional

O coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) mostrou um excesso de heterozigotos (valor do f negativo) para todos os locos analisados e ambos os valores diferiram significativamente de zero ($P < 0.05$) (Tabela 22). Segundo a estatística F de Wright, os valores do F_{ST} variaram de 0.180 (PN3) a 0.269 (PN13) e foram estatisticamente significativos ($P < 0.05$). O índice R_{ST} obteve valores entre 0.005 (PN13) a 0.737 (PN11). Os índices G_{ST} e D_{ST} indicaram que o locus PN3 ($G_{ST}= 0.494$ e $D_{ST}= 0.242$) apresenta uma maior diferenciação em relação aos demais locos (Tabela 22).

A Análise Molecular de Variância (AMOVA) revelou que a maior percentagem da variação genética (89%) encontra-se dentro das populações

(Tabela 23). A diferenciação observada entre os grupos foi de 22%. O índice de fixação (F_{ST}) foi de 0.229 com p altamente significativo (<0.00001) indicando, portanto, estruturação genética entre as populações analisadas (Tabela 23).

Tabela 22. Valores obtidos para os índices da Estatística- F e Diferenciação genética em populações de *P. nattereri* com base em oito locos microssatélites.

Locos	F_{IS} (f)	F_{IT}	F_{ST}	R_{ST}	G_{ST}	G_{ST}'	D_{ST}	D_{ST}'
PN1	- 0.155*	0.133	0.249*	0.035	0.043	0.022	0.006	0.008
PN2	- 0.158*	0.121	0.241*	0.056	0.056	0.037	0.007	0.009
PN3	- 0.152*	0.055	0.180*	0.318	0.494	0.550	0.242	0.323
PN5	- 0.159*	0.129	0.249*	-0.011	0.094	0.089	0.035	0.047
PN6	- 0.150*	0.084	0.204*	0.129	0.322	0.366	0.209	0.278
PN7	- 0.168*	0.126	0.252*	0.052	0.128	0.131	0.079	0.105
PN11	- 0.215*	0.025	0.198*	0.737	0.410	0.448	0.185	0.246
PN13	- 0.075*	0.207	0.269*	-0.005	0.007	-0.008	-0.003	-0.004
Média	-0.158*	0.144	0.232*	0.177	0.208	0.232	0.095	0.126

F_{IS} = coeficiente de endocruzamento, F_{IT} = coeficiente de endocruzamento total, F_{ST} = índice de fixação por comparação entre subpopulações para o total de populações, R_{ST} = análogo do F_{ST} para marcadores microssatélites, G_{ST} = estimador da diferenciação relativa, G_{ST}' = medida padronizada da diferenciação relativa, D_{ST} = estimador da diferenciação absoluta, D_{ST}' = medida padronizada da diferenciação absoluta. Nível de significância, * $P < 0.05$.

Tabela 23. Resultados da AMOVA para as quatro populações de *P. nattereri* com base em oito locos microssatélites, considerando cada localidade como um único grupo.

Tipos de variação	Componentes de variação	% Total de variação	F_{ST}	p
Entre grupos	0.499	22	0.229	<0.00001
Entre populações dentro dos grupos	0.258	-12		
Dentro de populações	1.933	89		

$P < 0.05$, indica diferença estatística significativa.

5.4.3. Distância genética e Detecção de *locos outlier*

Os índices de distância (D_a) e similaridade genética (D_i) observados entre as populações de *P. nattereri* estão sumarizados na tabela 24. A distância genética entre as populações mostrou índices de variação de 0.009 (Mearim/Pindaré) a 0.580 (Parnaíba/Itapecuru). Os índices de similaridade genética (D_i) variaram de 0.990 (Mearim/Pindaré) a 0.559 (Itapecuru/Parnaíba).

A construção do dendograma baseado na distância genética revelou a formação de três clados distintos. O primeiro clado agrupou os espécimes da

bacia Parnaíba, o segundo foi formado por exemplares da bacia Itapecuru e o terceiro clado reuniu os indivíduos das bacias Mearim e Pindaré (Figura 9).

Foram detectados dois locos candidatos a *locos outlier* (PN7 e PN11) e estes, possivelmente estão relacionados com a adaptação local desta espécie. Os demais locos se mostraram neutros.

Tabela 24. Matriz de Distância genética (Da) abaixo do diagonal e Similaridade genética (Di) acima do diagonal entre as populações de *P. nattereri* com base em oito locos microssatélites.

	Parnaíba	Itapecuru	Mearim	Pindaré
Parnaíba	-	0.559	0.699	0.697
Itapecuru	0.580	-	0.890	0.847
Mearim	0.357	0.116	-	0.990
Pindaré	0.359	0.164	0.009	-

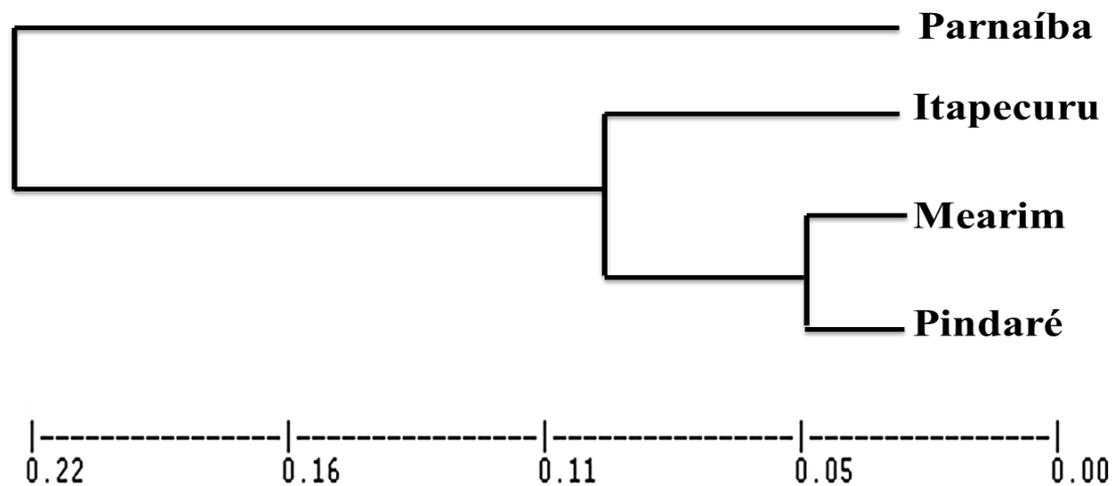


Figura 9. Dendrograma de Neighbour-Joining (NJ) para as populações de *P. nattereri* com base em oito locos microssatélites.

6. DISCUSSÃO

6.1. Gene rRNA 16S

A taxonomia da subfamília Serrasalminae apresenta vários aspectos controversos, ocorrendo discordância entre os autores quanto à sua posição sistemática (NAKAYAMA, 2007). Estudos moleculares com base no mtDNA têm demonstrado que os gêneros *Pygocentrus* e *Serrasalmus* constituem um único clado de peixes de águas doce da América do Sul (ORTÍ et al., 2008). Segundo Torrico (2004) a espécie *P. nattereri* demonstra uma grande diversidade genética intraespecífica que pode estar relacionado à geomorfologia de sua área de distribuição.

A análise das sequências obtidas para os espécimes de *P. nattereri* através do gene rRNA 16S do mtDNA evidenciou que sua composição de bases é rica em Adenina (30.6%). O mesmo padrão foi observado por Freeman et al. (2007) com gêneros da subfamília Serrasalminae, dentre eles o gênero *Pygocentrus*, cuja composição nucleotídica apresentou uma maior percentagem para a base adenina (30%). Resultados similares foram encontrados por Lima (2010) com espécies da família Characidae (31.1%) oriundos da bacia do rio Itapecuru - MA. Segundo Soares (2008) tal tendência é comum dentro do grupo dos vertebrados.

Quando as populações de *P. nattereri* foram consideradas como um único grupo foi observado à presença de 23 haplótipos e índices elevados de diversidade haplotípica ($h= 0.950$). Analisando as populações separadamente, foram encontrados índices de diversidade genética variando 0.895 (Mearim) a 0.819 (Parnaíba). Lima (2010) em seu estudo sobre a sistemática molecular de characídeos com base no gene rRNA 16S, encontrou 25 haplótipos entre os 84 espécimes (13 espécies) analisados e diversidade haplotípica de 0.867.

O haplótipo quinze (Hapl-15) foi o mais frequente, ocorrendo sete vezes entre exemplares das bacias Mearim e Pindaré. A maior frequência deste haplótipo evidencia uma combinação de polimorfismos transmitidos em conjunto para os descendentes de *P. nattereri* destas bacias. Segundo Kidd & Ritchie (2006) os haplótipos com maior frequência são provavelmente os mais antigos, enquanto os haplótipos com menor frequência são possivelmente os mais

recentes. Em sua maioria, os haplótipos mais recentes encontrados faziam parte das populações Itapecuru e Parnaíba.

A reconstrução filogenética gerada por diferentes métodos (MP, MV e NJ) mostrou um clado bem suportado, agrupando os espécimes de *P. nattereri* com valores de *bootstrap* variando de 99 a 100%. As análises filogenéticas também revelaram indícios de duas linhagens evolutivas distintas. Hubert et al. (2007) avaliaram as relações filogenéticas entre gêneros da subfamília Serrasalminae (*Pygocentrus*, *Pristobrycon*, *Pygopristis*, *Catoprion* e *Serrasalmus*) e observaram que os mesmos agruparam-se com 100% de *bootstrap* para MP e NJ. Resultados similares foram encontrados por Freeman et al. (2007) e Ortí et al. (2008) utilizando gêneros da mesma subfamília (*Catoprion*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon*, *Pygopristis*, *Metynnis*, *Piaractus* e *Serrasalmus*) e região mitocondrial (100% de *bootstrap* para MP).

A distância genética interpopulacional mostrou divergência entre os indivíduos da bacia Itapecuru e exemplares dos rios Parnaíba, Mearim e Pindaré (1%). Os espécimes da bacia Parnaíba também diferiram dos do rio Mearim e Pindaré (1%). Foi observada diferenciação intrapopulacional apenas para os exemplares das bacias Itapecuru (1%) e Pindaré (1%). Ortí et al. (2008) observaram que a distância genética entre espécies de Serrasalminae variaram de 5.5 a 14.4%, enquanto a divergência intraespecífica variou de 0 a 10.5%.

Mudanças ocorridas em nível de genoma em uma espécie, nem sempre aparecem na morfologia, o que torna fundamental a associação de estudos genéticos, morfológicos e ecológicos (TERENCIO, 2009). Os dados encontrados no presente estudo para o gene mitocondrial rRNA 16S contribuem na caracterização e diferenciação dos espécimes de *P. nattereri* ao longo das bacias analisadas.

6.2. Gene Citocromo Oxidase I (COI)

Em virtude da identificação de organismos como aspecto fundamental de diversos tipos de estudos biológicos, tais como ecologia, parasitologia, genética, entre outros, diversos métodos têm sido utilizados ou aprimorados para identificação de espécies. No âmbito desta tendência, a iniciativa do código de barra de DNA (DNA *barcode*) surgiu em 2003 com o intuito de fomentar a

padronização dos métodos moleculares utilizados para identificar espécies de organismos vivos, e aumentar a escala com que identificações confiáveis possam ser realizadas (CAMPBELL et al., 2000).

O gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) foi empregado no presente estudo por apresentar níveis de divergência apropriados para análises de diferenciação entre espécies (CLARK et al., 2001; CAMPBELL et al., 2000; FOOTIT et al., 2008; ROUGERIE et al., 2009; STEINKE et al., 2009) e ser considerado um dos mais indicados para caracterização específica de organismos (HEBERT et al., 2003). Hebert et al (2003) propõem que todos os organismos tenham seu próprio código de barra de DNA para que possam ser identificados a partir dele. Além disso, dados gerados pelo DNA *barcode* contribuem em pesquisas de taxonomia, de genética populacional e de análises filogenéticas.

Os resultados apresentados neste trabalho para o gene mitocondrial COI indicaram uma maior percentagem de Citosina (31.3%) entre as sequencias analisadas de *P. nattereri*. Esse valor está de acordo com os encontrados para o DNA *barcode* de outros animais (TAVARES et al., 2006; WARD et al., 2007). Foram observados índices de diversidade elevados quando consideradas todas as populações de *P. nattereri* ($h= 0.940$ e $NH= 23$). As populações das bacias Itapecuru e Pindaré apresentaram diversidade haplotípica de 0.886 e 0.895, respectivamente. Para os indivíduos das populações Parnaíba e Mearim foram observados índices de diversidade de 0.880 e 0.819, respectivamente.

Analisando a distribuição dos haplótipos em função da localidade foi observado que as bacias Mearim e Pindaré foram as que compartilharam mais haplótipos. Esta proximidade genética era esperada devido à proximidade geográfica entre estas, sendo a bacia Pindaré o principal afluente do rio Mearim (TEIXEIRA & SOUZA-FILHO, 2009; PIORSKI, 2010). O haplótipo sete (Hapl-7) foi o mais frequente, ocorrendo nove vezes, e compartilhado por espécimes das bacias Mearim, Pindaré e Itapecuru.

De acordo com Wright (1931), os valores de F_{ST} entre zero e 0.05 configuram baixa estruturação genética, entre 0.05 e 0.15 moderada, entre 0.15 e 0.25 é alta e acima de 0.25 estruturação genética forte. No presente estudo, a AMOVA revelou valor de F_{ST} compatível com uma forte estruturação genética

entre as populações de *P. nattereri* ($F_{ST}= 0.707$) e mostrou valor de p altamente significativo (0.00001). A AMOVA também indicou que a maior parte da variação molecular (64%) ocorre entre os grupos (Itapecuru/Parnaíba e Mearim/Pindaré) e apenas 29% foram atribuídas a diferenças dentro de cada população. O nível de diversidade e diferenciação genética entre populações são influenciadas por fatores como endogamia, deriva genética, fluxo gênico e desse modo, as estimativas da diversidade e sua distribuição entre e dentro de populações são fundamentais para estabelecer estratégias de conservação de espécies (WRIGHT, 1931).

As árvores filogenéticas (MP, MV e NJ) geraram topologias similares e agruparam os espécimes fortemente em um único clado com 99 a 100% de *bootstrap*, confirmando o monofiletismo do grupo. As análises filogenéticas também sugeriram a formação de dois grupos filogeneticamente distintos.

A diferenciação genética observada entre as populações variou de 0 a 2%. Os maiores índices de divergência foram encontrados entre exemplares da bacia Parnaíba e amostras dos rios Mearim e Pindaré (2%). Em relação à variação observada dentro das populações, apenas os indivíduos da bacia Itapecuru apresentaram divergência de 1%.

Como ferramenta taxonômica, o DNA *barcode* pode ser usado para a identificação molecular de várias espécies de peixes. O BOLD System usa o princípio "Hidden-Markov Model" baseado em um modelo probabilístico para alinhar sequências parecidas em um grande banco de dados (EDDY, 1998; RATNASINGHAM & HEBERT, 2007). Dados publicados relativos a identificação de espécies com a técnica *barcode* utilizando o BOLD só podem ser aceitos se a similaridade for maior que 97% (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007). No presente trabalho os espécimes de *P. nattereri* foram identificadas corretamente com similaridade a partir de 98.48% de confiabilidade, demonstrando, portanto, o poder resolutivo desta ferramenta e o status específico para os espécimes analisados.

A diversidade dos seres vivos baseia-se em polimorfismos contidos nas moléculas de DNA. Com o uso de marcadores moleculares mitocondriais é possível investigar essa diversidade genética, assim como, seu destino ao longo do tempo, traduzindo a sua evolução (KLACZKO & VIEIRA, 2003). Segundo o

pressuposto do DNA *barcode*, as sequências obtidas poderão ser utilizadas como “código de barras” na identificação dos espécimes de *P. nattereri*. Os resultados alcançados através do gene mitocondrial COI também auxiliariam na determinação dos níveis de diversidade nas bacias analisadas e evidenciou uma estruturação genética populacional significativa, o que resulta em um manejo independente para cada bacia, de modo a priorizar a diferenciação encontrada.

6.3. Região Controle

A obtenção de informações genéticas geradas por marcadores moleculares completam e fortalecem as pesquisas a respeito dos estoques pesqueiros, e de todo o genoma mitocondrial, a região controle é a que mais acumula mutações e apresenta grande variabilidade genética, o que a torna eficaz no estudo de genética de populações (CARVALHO et al., 2008).

A maior percentagem da base Adenina (30.6%) encontrada para a Região Controle neste trabalho está de acordo com a esperada em peixes neotropicais (SOARES, 2008). Os mesmos resultados foram obtidos por Hubert et al. (2007) utilizando a mesma espécie e região mitocondrial (31%). Estudando a filogeografia de *P. nattereri* da bacia do rio Madeira-AM com base na Região Controle, Torrico (2004) também encontrou uma maior frequência para a base adenina (31.7%). Padrão similar foi observado por Freeman et al. (2007) com gêneros da subfamília Serrasalminae (30%).

As estimativas de polimorfismo genético indicaram altos níveis de variabilidade genética nas bacias analisadas. Índices elevados de diversidade haplotípica foram observados para as populações quando agrupadas ($h= 0.978$) ou analisadas individualmente. Os maiores valores foram registrados para os exemplares dos rios Itapecuru ($h= 0.971$), Mearim ($h= 0.981$) e Pindaré ($h= 0.971$). Segundo Frankham et al. (2002) níveis altos de variabilidade genética em uma população permitem maior chance de sobrevivência, resistência a mudanças do meio ambiente, taxa de crescimento e sucesso reprodutivo aos indivíduos.

A análise de distribuição dos haplótipos mostrou uma maior similaridade genética entre espécimes das bacias Mearim e Pindaré evidenciado pelo compartilhamento de um maior número de haplótipos (cinco). Esta forte

similaridade entre as amostras dos rios Mearim e Pindaré também foi observada nos resultados gerados pelo BAPS visto que estas populações foram agrupadas em único *cluster*. A proximidade genética entre exemplares destas bacias pode ser resultado de características geomorfológico similar entre elas, e por ser o rio Pindaré o principal afluente do rio Mearim (TEIXEIRA & SOUZA-FILHO, 2009; PIORSKI, 2010).

Os testes de neutralidade de D (TAJIMA, 1989) e F_S (FU, 1997) mostraram desvio da hipótese nula de neutralidade seletiva para as bacias Itapecuru, Mearim e Pindaré ($P < 0.05$), indicando que provavelmente essas populações passaram por um processo recente de expansão populacional. O grande número de haplótipos únicos encontrados nestas populações corrobora esta hipótese, uma vez que um rápido crescimento populacional aumenta a retenção de novas mutações (AVISE, 1994). Torrico (2004) encontrou valores não significativos de D (-0.529) e F_S (0.217) para os espécimes de *P. nattereri* da bacia do Alto Madeira - AM, rejeitando, portanto, a hipótese de que há uma seleção controlando as mutações.

Em nossos dados sobre a hipótese de expansão recente mostrou-se plausível para estas bacias e teve como suporte os resultados dos testes de neutralidade sugeridos pelos valores negativos de D e F_S e pelo índice de diversidade haplotípica alto e nucleotídica baixo observados nestas populações. Esses resultados sugerem métodos de manejos diferenciados para cada bacia a fim se se preservar a variabilidade genética encontrada nas mesmas.

Os dados da AMOVA revelaram que a maior parte da variação genética se deve a diferenças encontradas entre os grupos (72%). O F_{ST} de 0.707 com p altamente significativo (<0.00001) indica que as populações de *P. nattereri* encontram-se estruturadas geneticamente. O conhecimento dos efeitos da variabilidade genética em uma população de peixes é essencial para o entendimento de como essa diversidade está distribuída em uma espécie. Se ela apresenta diversidade contínua, qualquer área de sua distribuição é representativa da espécie, enquanto que, havendo estruturação, a representatividade de cada subpopulação terá de ser preservada (TERENCIO, 2009).

As análises filogenéticas baseadas em diferentes métodos (MP, MV e NJ) indicaram que os espécimes formam um grupo monofilético fortemente suportado (99 a 100% de bootstrap) e revelaram ainda a formação de três unidades evolutivas distintas. O conceito de unidades evolutivas consiste na definição de uma população ou grupo de populações que se encontram diferenciados em termos genéticos, morfológicos ou ecológicos de populações próximas (co-específicas), refletindo uma história de isolamento geográfico em níveis variáveis. Estas populações, ao possuírem características próprias, merecem ser consideradas como unidades independentes para fins de conservação (TERENCIO, 2009).

Torrico (2004) observou que os espécimes de *P. nattereri* da bacia do Alto Madeira, Solimões e Ucayali agruparam-se com 100% de *bootstrap*. Ortí et al. (2008) utilizaram a região controle do mtDNA para determinar a filogenia dos serrasalmíneos e em seus resultados o monofiletismo do grupo também foi confirmado com suporte de *bootstrap* igual a 100%. Resultados similares foram observados por Hubert et al. (2007) e Freeman et al. (2007) com gêneros da subfamília Serrasalminae (*Serrasalmus* e *Pygocentrus*) através da região controle (100% de *bootstrap*).

Os maiores índices de divergência genética interpopulacional foram observados entre grupos dos rios Parnaíba e Mearim-Pindaré gerados no MEGA com base nos agrupamentos encontrados no BAPS (1.9%). Foram observados baixos índices de divergências dentro das populações analisadas (<0.5%). Hubert et al. (2007) observaram que a distância genética entre as populações de Serrasalminae foi de 1.2 a 3.0%, enquanto a diferenciação intraespecífica obteve valores entre 0.1 a 0.8%. Em seu estudo sobre a filogeografia de *P. nattereri*, Torrico (2004) encontrou valores de divergência variando de 0.29 a 1.12% entre os espécimes das bacias do rio Madeira, Ucayali e Solimões. Ortí et al. (2008) utilizando a mesma região mitocondrial, observaram valores de distância genética variando de 1.7 a 25.6% entre os serrasalmíneos.

Definir biologicamente uma população é extremamente importante para a tomada de decisões sobre a gestão dos recursos biológicos (BATISTA, 2010). As informações obtidas através da região controle forneceram dados

relevantes a cerca da variabilidade genética dos espécimes de *P. nattereri* e revelou uma tendência de estruturação populacional ao longo das bacias analisadas, dados estes, que serão importantes para desenvolver uma política de gestão e conservação adequada para cada bacia isoladamente, tendo em vista o grau de diferenças genéticas encontradas entre as mesmas.

6.4. Locos Microsatélites

Os estudos ligados à genética populacional objetivam principalmente verificar a estruturação genética entre as populações, especialmente em locais distantes ou com alguma barreira biogeográfica, que pode ser física, química, biótica ou abiótica (NASCIMENTO, 2009). Os microsatélites são considerados marcadores mais eficientes na revelação da variação alélica e altos níveis de variabilidade, podendo detectar diferenças mesmo entre populações intimamente relacionadas (POVH, 2007).

As análises genéticas realizadas para os 48 espécimes de *P. nattereri* com base em oito locos de microsatélites revelaram a ocorrência de 104 alelos com variação de 3 a 10 alelos/locus. Nascimento et al. (2012) desenvolveram 11 locos de microsatélites para 35 indivíduos de *P. nattereri* da bacia Solimões - AM e número de alelos por locus variou de 4 a 24 alelos. Analisando 13 locos de microsatélites em 20 indivíduos do tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) do rio Amazonas, Hamoy et al. (2011) encontraram variação 4 a 10 alelos por locos.

A heterozigosidade observada e esperada variou de 0.438 a 0.510 e 0.362 a 0.494, respectivamente. Os maiores índices de heterozigosidade foram observados para as populações Itapecuru, Mearim e Pindaré. O excesso de heterozigotos nestas bacias também foi confirmado pelo índice de endogamia (f), manifestado pelos valores negativos deste (WRIGHT, 1978). A bacia Parnaíba apresentou o menor índice de heterozigosidade e valor positivo para o índice f , indicando déficit de heterozigotos nesta população. Dos oito locos utilizados, três apresentaram desvio significativo para o EHW (PN2, PN3 e PN11).

Estudos realizados por Nascimento et al. (2012) mostraram heterozigosidade observada variando de 0.300 a 0.824 e esperada entre 0.261

a 0.779 para populações de *P. nattereri*, e apenas um locus (PN11) desviou significativamente do EHW. Santana et al. (2012) estudando populações de *C. macropomum* do rio Amazonas, observaram índices de heterozigosidade observada e esperada entre 0.318 a 1.000 e 0.729 a 0.949, respectivamente, e dos 14 locos analisados, cinco apresentaram desvio significativo para o EHW (TB1, TB2, TB3, TB4 e TB9). Hamoy et al. (2011) observaram em seus trabalhos sobre o tambaqui *C. macropomum*, uma heterozigosidade variando de 0.31 a 0.95, porém, os locos não apresentaram desvio significativo.

O Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) variou de 0.223 a 0.734 e dois alelos mostraram-se altamente polimórficos (PN6= 0.631 e PN7= 0.734). Nascimento et al. (2012) encontraram valores do PIC entre 0.238 e 0.758 estudando populações de *P. nattereri*. Em suas análises sobre a espécie *C. macropomum*, Hamoy & Santos (2012) observaram que o PIC obteve uma média de 0.76 com base em 12 locos microssatélites. Os estudos realizados por Santana et al. (2012) em populações de *C. macropomum* obtiveram valores do PIC entre 0.661 a 0.926. Os locos PN3, PN6 e PN11 demonstraram maior frequência de alelos nulos. A existência de alelos nulos parece ser problema comum em locos microssatélites (CALLEN et al., 1933; O'CONNELL & WRIGHT, 1997).

Os locos PN5 e PN7 apresentaram os maiores índices de variação alélica e número de alelos (PN5= 5.6/10 alelos, PN7= 5.8/9 alelos). Estes também exibiram os maiores valores de variação gênica (PN5= 0.68 e PN7= 0.81). Em relação aos índices de diferenciação genética, o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) mostrou um excesso de heterozigotos para todos os locos analisados, valores estes, negativos e significativos ($P < 0.05$) (WRIGHT, 1978).

Os valores de F_{ST} (0.180 a 0.269) também foram estatisticamente significativos ($P < 0.05$) e indicaram estruturação genética entre as populações. O índice R_{ST} obteve valores entre 0.005 a 0.737, os quais foram significativos apenas para três locos (PN3, PN6 e PN11) com $P < 0.05$. Embora o índice de F_{ST} seja análogo ao R_{ST} , as diferenças nos resultados se devem aos diferentes modelos de diferenciação nos quais são baseados. Enquanto o F_{ST} baseia-se no Modelo de Alelos Infinitivos (IAM), o índice R_{ST} baseia-se no modelo *passo a passo* SMM (Stepwise Mutation Model) (SLATKIN, 1995).

A AMOVA indicou que a maior parte da variação molecular se deve a diferenças dentro de cada população (89%). O índice de fixação (F_{ST}) dessa variação foi de 0.229 com p altamente significativo (<0.00001). Esses resultados indicam que as populações analisadas encontram-se diferenciadas, o que justificaria a manutenção destas populações isoladas no caso de conservação genética, para que não haja a perda da maior variabilidade encontrada.

A matriz de distância genética mostrou uma maior similaridade entre os espécimes da bacia Mearim e Pindaré (0.990). Segundo Nascimento (2009), o fluxo gênico está relacionado a transferência de genes de uma população para a outra. Quando está ocorrendo migração entre as populações, podem ocorrer mudanças nas frequências de *pools* de genes. O rio Pindaré é o principal afluente do rio Mearim e não há evidências de barreiras físicas, o que aumentaria a probabilidade de fluxo gênico e explicaria a similaridade genética entre os espécimes de *P. nattereri* destas bacias. Os indivíduos das bacias Itapecuru e Parnaíba, no entanto, se mostraram menos similares (0.559).

O dendograma de Neighbor-Joining (NJ) mostrou a formação de três clados filogeneticamente distintos, formados por espécimes da bacia Parnaíba, Itapecuru e Mearim-Pindaré, respectivamente. O software DetSel detectou a presença de dois marcadores microssatélites candidatos a *locos outlier* (PN7 e PN13). A adaptação local da piranha vermelha *P. nattereri*, possivelmente, está relacionada a estes locos.

Segundo Boettcher et al. (2010), para mantermos a diversidade genética dos organismos é necessário propor medidas que possam minimizar os efeitos das mudanças genéticas dentro de uma dada população biológica. Neste contexto, uma medida a ser adotada seria a manutenção e conservação da riqueza alélica preservando, principalmente, os alelos raros presentes dentro de cada população (PÉREZ-RUZAFÁ et al., 2006). Em nossos resultados, os espécimes de *P. nattereri* apresentaram diversidade alélica significativa para os locos de microssatélites analisados e revelou uma tendência de estruturação populacional ao longo das bacias analisadas, o que ressalta a importância de planos de manejo e conservação diferenciados para cada estoque pesqueiro de modo a priorizar a variação encontrada.

7. CONCLUSÕES

❖ Os marcadores moleculares mitocondriais (rRNA 16S, COI e Região Controle) e do tipo microssatélites mostraram-se ferramentas eficientes na análise da variabilidade e estruturação genética populacional de *P. nattereri* nas bacias analisadas;

❖ Os espécimes das bacias Itapecuru, Mearim e Pindaré apresentaram os maiores índices de diversidade haplotípica (h) para os três genes mitocondriais utilizados, como também, para os locos microssatélites, evidenciados pelo índice de endogamia (f) que revelou heterozigosidade acentuada nestas populações;

❖ As análises filogenéticas baseadas no DNA mitocondrial e locos microssatélites corroboram com a formação de três linhagens evolutivas distintas (Parnaíba, Itapecuru e Mearim-Pindaré);

❖ A hipótese de expansão populacional recente, testada com base na Região Controle, mostrou-se plausível para as bacias Itapecuru, Mearim e Pindaré e teve como suporte os resultados significativos dos testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (F_S);

❖ A Análise Molecular de Variância (AMOVA) mostrou valores de F_{ST} altamente significativos tanto para o genoma mitocondrial (COI e Região Controle) como nuclear (microssatélites), indicando forte estruturação genética entre as populações, o que sugere manejos diferenciados para cada bacia;

❖ Os índices de diferenciação interpopulacional registrados para os dois genomas foram análogos, e mostraram uma maior similaridade genética entre os espécimes dos rios Mearim e Pindaré;

❖ Os resultados apresentados neste trabalho contribuem com informações relevantes a cerca da estrutura genética das populações de *P. nattereri* em quatro das principais bacias hidrográficas maranhenses e destacam a importância de propor políticas de manejo e conservação individualizados, a fim de se preservar a variabilidade encontrada em cada bacia.

8. REFERÊNCIAS

- AB'SÁBER, A. N. Contribuições à Geomorfologia do Estado do Maranhão. Transcrito do "Anuário da Faculdade de Filosofia". Universidade Católica de São Paulo. vol.13. p. 35-49, 1960.
- ALCÂNTARA, E. H. Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Itapecuru, Maranhão-Brasil. *Caminhos de Geografia*, v. 7, n. 11, p. 97-113, 2004.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. Conservation and the genetics of populations. *Blackwell Publishing*, Oxford, 2007. 641p.
- ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, p. 301-305, 2002.
- ASHLEY, P. J. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, Amsterdam, vol. 104, p. 199-235, 2007.
- AVISE, J. C. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, p. 325-342, 1986.
- AVISE, J. C.; NEIGEL, J. E.; ARNOLD, J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, v. 20, p. 99-105, 1994.
- BARROS, L. A. et al. Aspectos ecológicos de endoparasitos de piranha vermelha (*Pygocentrus nattereri*, Kner 1860) proveniente do rio Cuiabá. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 1, p. 228-231, 2010.
- BARKER, G. C. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, p. S1/21 - S1/24, 2002.
- 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. 2010. 128 f. Tese (Doutorado em Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, Manaus, Amazonas. 2010.
- BEHR, E. R.; SIGNOR, C. A. Distribuição e alimentação de duas espécies simpátricas de piranhas *Serrasalmus maculatus* e *Pygocentrus nattereri* (Characidae, Serrasalminae) do rio Ibicuí, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, v. 98, n. 4, p. 501-507, 2008.

BELKHIR, K. et al. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France), 2004.

BENITES, C. Caracterização genética do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia hidrográfica Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares tipo microssatélite. 2008. 74 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal, São Paulo. 2008.

BOETTCHER, P. J. et al. Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources. *Animal Genet*, v. 41, p. 64-77, 2010.

BORBA, R. S. et al. Genetic structure of the ornamental tetra fish species *Piabucus melanostomus* Holmberg, 1891 (Characidae, Iguanodectinae) in the Brazilian Pantanal wetlands inferred by mitochondrial DNA sequences. *Biota Neotropical*, v. 13, n. 1, p. 42-46, 2013.

BOWCOCK, A. M. et al. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, v. 368, p. 455-457, 1994.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. Peixes do Pantanal. Manual de Identificação. Embrapa Corumbá/SP, 1999. 184 p.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFE, S. A; DESALLE, R. Relationships among characiformes fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 36, p. 135-153, 2005.

CAMPBELL, K. E. J; FRAILEY, C. D; ROMERO-PITTMAN, L. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation Amazonian, and the bird of modern Amazon River system. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*, v. 239, p. 166-219, 2006.

CARVALHO, L. R. M. et al. Amplificação por PCR da região controle do DNA mitocondrial de raças de *Bombyxmori*. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*, v. 11, n. 1, p. 15-19, 2008.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 126, p. 455-476, 2000.

CHENG, Y. Z. et al. Universal primers for amplification of the complete mitochondrial control region in marine fish species. *Molecular Biology*, v. 46, n. 5, p. 727-730, 2012.

CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: review with special references to fish genetics. *Aquaculture*, v. 255, p. 1-29, 2006.

- CIONE, A. L. et al. *Megapiranha paranensis*, a new genus and species of Serrasalminae (Characiformes, Teleostei) from the upper Miocene of Argentina. *Journal of Vertebrate Paleontology*, v. 29, n. 2, p. 350-358, 2009.
- CORANDER, et al. BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure. Version 6.0. 2013.
- EDDY, S. R. Profile Hidden Markov models. *Bioinformatics Review*, v. 13, n. 9, p. 755-763, 1998.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- FARIAS, I. P.; MEYER, A.; ORTI, G. Total evidence: Molecules, morphology and the phylogenetics of cichlid fishes. *JournalSeek entry for Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, v. 288, p. 76-92, 2000.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.
- FRAGA, E. et al. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *Journal Applied Ichthyology*, v. 23, n. 5, p. 598-604, 2007.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. R.; BRISCOE, D. A. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Cambridge, England, 2002. 640 p.
- FREEMAN, B. et al. Molecular systematic of Serrasalminae: Deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. *Zootaxa*, v. 1484, p. 1-38, 2007.
- FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth hitchhiking and background selection. *Genetics*, v. 1447, p. 915-925, 1997.
- GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Updated from Goudet J. (1995). FSTAT, a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, v. 86, p. 485-486, 2001.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAMOY, I. G. et al. Isolation and characterization of tri and tetranucleotide microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes). *Conservation Genetics Resources*, v. 3, p. 33-36, 2011.

HAMOY, I. G.; SANTOS, S. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the tambaqui, *Colossoma macropomum*, developed as a tool for use in conservation and broodstock management. *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 1, p. 141-146, 2012.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identification through DNA barcode. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 279, p. 313-322, 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA Barcode. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 270, p. 313-322, 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DeWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 270, p. 96-99, 2003b.

HEBERT, P. D. N. et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 12, p. 1-6, 2004a.

HEBERT, P. D. N. et al. Identification of Birds through DNA Barcode. *Plos Biology*, v. 2, n. 10, p. 1657-1663, 2004b.

HUBERT, N. et al. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, v. 16, n. 10, p. 2115-2136, 2007.

HUBERT, N. et al. Identifying canadian freshwater fishes trough DNA barcodes. *Plos One*. v. 3, n. 6, 2008.

IERVOLINO, F.; RESENDE, E. K.; HILSDORF, A. W. S. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA Região Controle region: Implications for fishery management. *Fisheries Research*, v. 101, n. 1-2, p. 27-31, 2010.

IVANOVA, N. V. et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*. n. 7, p. 544-548, 2007.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, v.16, p. 1099-1106, 2007.

KATTI, M. V.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Differential distribution of simples sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution*, v. 18, p. 1161-1167, 2001.

KEENEY, D. B. et al. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the

northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 1911-1923, 2005.

KHEDKAR, G. D. et al. Zoology, Paul Hebert Centre for DNA Barcoding and Biodiversity Studies, Babasaheb Ambedkar Marathwada University, Aurangabad, Maharashtra 431004, India, 2012.

KIMURA, M.; CROW, J. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, v. 49, p. 725-738, 1964.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 75, p. 2868-2872, 1978.

KLACZKO, L. B.; VIEIRA, R. D. Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil: Genética versão preliminar. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Diretoria de Conservação da Biodiversidade. *Projeto Estratégia Nacional de Diversidade Biológica*, 2003.

LEVINSON, G.; GUTMAN, A. G. Slipped-Strand Mismatching: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, p. 203-221, 1987.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic Data, Version 1.0. (d15). University of Connecticut, Storrs, Connecticut, 2000.

LI, Y. C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

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

LIMA, J. R. *Sistemática molecular de peixes da família Characidae (Characiforme, Osthariophysi) da bacia do rio Itapecuru, Maranhão*. 2010. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, Maranhão. 2010.

MACHADO-ALLISON, A. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae (Teleostei-Characidae). Parte III. Sobre el estatus genérico y relaciones filogenéticas de los géneros *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* y *Serrasalmus* (Teleostei, Characidae, Serrasalminae). *Acta Biológica Venezuelica*, v. 12, n. 1, p. 19-42, 1985.

MACHADO-ALLISON, A.; FINK, W. Sinopsis de las especies de la subfamilia Serrasalmine presentes en la cuenca del Orinoco. Claves, Diagnóstico e Ilustraciones. LITO COLOR R.I., C.A. Caracas-Venezuela, 1995. 90p.

- MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, v. 2, p. 1-38, 1993.
- NAHUM, L. A. *Evolução dos Genomas*. In: Matioli, Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto, Holos Ed., 2001.
- NAKAYAMA, C. M. Citogenética molecular comparativa DNAr 18S e 5S em piranhas (Serrasalminae, Characidae) da Amazônia Central. 2007. 80 f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 2007.
- NAKATANI, M. et al. Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeen origin and Mesozoic radiation. *Evolutionary Biology*, vol. 11, no. 1, p. 11-177, 2011.
- NASCIMENTO, A. D. Mercúrio total em peixes carnívoros e variabilidade genética do pacú (*Piaractus mesopotamicus*) por meio de microssatélites - provenientes do rio Paraguai e rio Cuiabá – Alto Pantanal, MT. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres, Mato Grosso. 2009.
- NASCIMENTO, P. R. M. et al. Isolation and development microsatellite markers in the *Pygocentrus nattereri* (Kner 1858), an important freshwater fish in the Amazon. *Conservation Genetics Resources*, v. 4, p. 271-274, 2012.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 70, n. 12, p. 3321- 3323, 1973.
- ORTÍ, G. et al. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, n. 1, p. 343-351, 2008.
- OYAKAWA, O. T. et al. Peixes de riachos da Mata Atlântica nas unidades de conservação do Vale do Rio Ribeiro de Iguarapé no estado de São Paulo. São Paulo, Neotrópica, 2006.
- PALUMBI, S. et al. The simple fool's guide to PCR ver. 2.0. University of Hawaii, Honolulu, 1991.
- PALUMBI, S. R. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. p. 205-247. In: HILLS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. (Eds.). *Molecular Systematics* 2nd. ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 1996. 655 p.
- PEREIRA, L. H. G. et al. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *Genetics*, v. 14, p. 1-14, 2013.
- PÉREZ-RUZAFÁ, A. et al. Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations. *Biological Conservation*, v. 129, p. 244-255, 2006.

PIORSKI, N. M.; CASTRO, A. C. L.; SOUSA-NETO, M. A. S. Peixes do cerrado da Região Sul Maranhense. In: BARRETO, L. et al. Cerrado do Norte do Brasil. North cerrado of Brazil. Pelotas: Ed. USEB, 2007. 378 p.

PIORSKI, N. M. Diversidade genética e filogeografia das espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos - UFSC. 153 p. Tese de Doutorado em Genética e Evolução, 2010.

POMPÊO, M. L. M.; MOSCHINI-CARLOS, V.; SILVA-FILHO, C. G. Rios Pré-Amazônicos (Estado do Maranhão - Brasil). *Bioikos*, v. 16, p. 29-39, 2002.

PORTO, J. I. R. et al. Using molecular biology techniques to characterize the diversity of amazonian ornamental fishes. In: CHAO, N. L. et al. (Ed.). Conservation and Management of ornamental fish resources of the rio Negro Basin, Amazonia, Brazil (p. 227-244). Project Piaba. Editora da Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas, 2001.

POVH, J. A. Avaliação da Diversidade Genética e do Manejo Reprodutivo do Pacu, *Piaractus mesopotamicus*. 2007. 82 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. 2007.

QUEIROZ, H.; MAGURRAN, A. Estudo da ecologia e do comportamento dos cardumes de piranhas caju (*Pygocentrus nattereri*, Serrasalminidae) na Reserva Mamirauá. Manaus, Amazonas, 2002.

QUEIROZ, H. L. et al. Reproductive strategies of Red-bellied Piranha (*Pygocentrus nattereri* Kner, 1858) in the white waters of the Mamirauá flooded forest, central Brazilian Amazon. *Environmental Biology of Fishes*, vol. 89, no. 1, p. 11-19, 2010.

QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 8, p. 285-298, 1993.

RAFALSKI, J. A. et al. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, v. 43, p. 223-225, 1989.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, v. 43, p. 223-225, 1989.

ROZAS, J. et al. DNAsp v5.1: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v. 25, p. 1451-1452, 2010.

SACCONE, C. et al. Evolution of the mitochondrial system: an overview. Elsevier Science. *Gene*, v. 261, p. 153-159, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory press. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, p. 5463-5468, 1977.

SANTA BRÍGIDA, E. L. et al. Population analysis of *Scomberomorus cavalla* (Perciformes, Scombridae) from the Northern and Northeastern coast of Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 67, p. 919-924, 2007.

SANTANA, M. P. et al. Diversidade cariotípica da piranha vermelha *Pygocentrus nattereri* (Characiformes, Characidae) rio Salobo, bacia do Araguaia, Pará, Brasil. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, v. 2, n. 1, p. 98-103, 2011.

SANTANA, G. X. et al. Isolation of novel microsatellite markers for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Curvier 1818), an important freshwater fish of the Amazon. *Conservation Genetic Resour*, v. 4, p. 197-200, 2012.

SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genetic Molecular Biology*, v. 26, p. 151-161, 2003.

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

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E.; ZUANON, J. Peixes Comerciais de Manaus. 2 ed. Manaus, Ibama-ProVárzea, 2006.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics*, v. 5, p. 63-69, 2004.

SLATKIN, M. A. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v. 130, p. 457-462, 1995.

SOARES, E. C. Peixes do Mearim. São Luís, Instituto Geia, 2005.

SOARES, A. A. Estudos filogenéticos na superfamília Loricarioidea (Teleostei: Siluriformes) com base em sequências do DNA nuclear e mitocondrial. 2008. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, São Paulo. 2008.

STELLA, A. Síntese do diagnóstico, matriz do plano e contribuições do processo de consulta pública para elaboração do PPCD-MA. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Brasília, Distrito Federal, 2011.

- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.
- TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Molecular Biology and Evolution*, v. 9, n. 4 p. 678-687, 1992.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.
- TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p.2731-2739, 2011.
- TAUTZ, D; RENZ, M. Simple Sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 12, p. 4127-4138, 1984.
- TAUTZ, D; SCHLÖTTERER, C. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 4, p. 832-837, 1994.
- TAVARES, E. S. et al. Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial na nuclear DNA sequences. *Systematic Biology*, v. 55, p. 454-470, 2006.
- TEIXEIRA, S. G., SOUZA-FILHO, P. W. M. Mapeamento de ambientes costeiros tropicais (golfão Marenhense, Brasil) utilizando imagens de sensores remotos orbitais. *Revista Brasileira de Geofísica*, vol. 27, no. 1, p.69-82, 2009.
- TERENCIO, M. L. Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA mitocondrial de *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) da bacia do rio Negro. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, Manaus, Amazonas. 2009.
- TERENCIO, M. L.; SCHNEIDER, C. H.; PORTO, J. I. R. Molecular signature of the Região Controle in the brown pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, v. 81, p. 110-124, 2012.
- TERENCIO, M. L. et al. Structure and organization of the mitochondrial DNA control region with tandemly repeated sequence in the Amazon ornamental fish. *Mitochondrial DNA*, v. 24, p. 74-82, 2013.
- THUESEN, P. A. et al. Genetic differentiation over small spatial scales in the absence of physical barriers in an Australian rainforest stream fish. *Journal of Fish Biology*, v. 72, p. 1174-1187, 2008.

- THOMPSON, J. D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.
- TORRICO, J. P. Filogeografía comparada de siete especies de peces de agua dulce del Alto Madeira (Amazonía Boliviana). 2004. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciencias Biológicas y Biomédicas) - Universidad Mayor de San Andrés, San Andrés, Bolivia. 2004.
- VITALIS, R. et al. DetSel 1.0: a computer program to detect markers responding to selection. *Journal of Heredity*, v. 94, n. 5, p. 429-431, 2003.
- WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, n.360, p. 1847-1857, 2005.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, v. 38, p. 1358-1370, 1984.
- WOLFF, R. K. et al. Unequal crossing over between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics*, v. 5, p. 382-384, 1989.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, n.16. p. 97-159, 1931.
- WRIGHT, S. Evolution and genetic population: variability within and among natural populations. v. 4. Chicago III: University of Chicago Press, 1978.
- ZHU, Y.; QUELLER, D. C.; STRASSAMANN, J. E. A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. *Journal Molecular Evolution*, v. 50, p. 324-338, 2000.

ANEXOS

Anexo I. Protocolo de extração de DNA com Fenol-Clorofórmio de Sambrook & Russel (2001) (adaptado para microtubos de 1,5 mL).

- Adicionar 20 mg de tecido muscular em um microtubo de 1,5 mL;
- Adicionar 300 µl de tampão de lise, 300 µl de tampão de homogeneização e 15 µl da enzima RNase (modificado para 600 µl tampão de lise e 5 µl da enzima RNase) . Incubar por 40 minutos a 37°C na estufa;
- Adicionar 15 µl de proteinase K e agitar delicadamente os tubos em um agitador, a uma temperatura de 55°C por 30 minutos; deixar esfriar até a temperatura ambiente;
- Adicionar 700 µl de fenol-clorofórmio-álcool-isoamil a uma concentração de 25:24:1, para precipitação de proteínas. Agitar os tubos delicadamente por cerca de 10 minutos;
- Centrifugar a 10.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos;
- Transferir cuidadosamente a camada superior formada após a centrifugação para um novo tubo de 1,5 mL;
- Adicionar 700 µl de clorofórmio-álcool-isoamílico a uma concentração de 24:1 e agitar delicadamente por 10 minutos;
- Centrifugar a 10.000 rpm por mais 10 minutos;
- Transferir a camada sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL;
- Adicionar 100 µl de acetato de sódio (AcNa) 3 M pH 4.8 e 700 µl de isopropanol (100%) para precipitar o DNA. Agitar a mistura gentilmente até a visualização da nuvem de DNA e congelar a uma temperatura de 20°C por 1 hora, no mínimo;
- Após o congelamento, centrifugar a mistura por 10 minutos a 10.000 rpm e descartar o material sobrenadante cuidadosamente para que o pellet de DNA não seja perdido;
- Adicionar 200 µl de etanol a 70% e centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm. Descartar o sobrenadante cuidadosamente para não perder o pellet de DNA;
- Colocar o tubo aberto na estufa a 37°C por cerca de 30 minutos, para a completa evaporação do álcool.

Anexo II. Artigo científico aceito na revista Brazilian Journal of Biology (B1) – BJB – 002/2014.

Genetic differentiation in the populations of red piranha, *Pygocentrus nattereri* Kner (1860)

(Characiformes: Serrasalminae), from the river basins of northeastern Brazil

L. A. da Luz^a, L. da L. dos Reis^a, I. Sampaio^c, M. C. Barros^{a,b} and E. Fraga^{a,b}

^aMasters Program in Animal Science (CMCA), Agricultural Sciences Center - CCA, Maranhão State University - UEMA, Tirirical, s/n, 65058-250, Cidade Operária, São Luís, MA, Brasil.

^bGenetics and Molecular Biology Laboratory, Department of Chemistry and Biology, UEMA, Praça Duque de Caxias, s/n, 65604-380, Morro do Alecrim, Caxias, MA, Brasil.

^cGenetics and Molecular Biology Laboratory, Institute of Coastal Studies, Federal University of Pará - UFPA, Alameda Leandro Ribeiro, s/n, 68600-000, Aldeia, Bragança, PA, Brasil.

lucianaluz_alves@hotmail.com

(With 4 figures)

Genetic differentiation of *Pygocentrus nattereri*

Abstract

The red piranha, *Pygocentrus nattereri*, is an important resource for artisanal and commercial fisheries. The present study determines the genetic differentiation among *P. nattereri* populations from the northeastern Brazilian state of Maranhão. The DNA was isolated using a standard phenol-chloroform protocol and the Control Region was amplified by PCR. The PCR products were sequenced using the dideoxyterminal method. A sequence of 1041 bps was obtained from the Control Region of 60 specimens, which presented 33 polymorphic sites, 41 haplotypes, $h = 0.978$ and $\pi = 0.009$. The neutrality tests (D and F_S) were significant ($P < 0.05$) for most of the populations analyzed. The AMOVA indicated that most of the molecular variation (72%) arises between groups. The fixation index was highly significant ($F_{ST} = 0.707$, $P < 0.00001$). The phylogenetic analyses indicated that the specimens represented a monophyletic group. Genetic distances between populations varied from 0.8% to 1.9%, and were $< 0.5\%$ within populations. The degree of genetic differentiation found among the stocks of *P. nattereri* indicates the need

for the development of independent management plans for the different river basins in order to preserve the genetic variability of their populations.

Keywords: DNA mitochondrial, Control Region, Variability, Management, Conservation.

Diferenciação genética em populações da piranha vermelha, *Pygocentrus nattereri* Kner (1860) (Characiformes: Serrasalminae), em bacias hidrográficas do nordeste do Brasil

Resumo

A piranha vermelha, *Pygocentrus nattereri*, é um recurso importante para pesca artesanal e comercial. O presente estudo determinou a diferenciação genética entre populações de *P. nattereri* no nordeste do estado brasileiro do Maranhão. O DNA foi isolado utilizando o protocolo de Fenol-clorofórmio e a Região Controle foi amplificada por PCR. Os produtos da PCR foram sequenciados usando o método didesoxiterminal. Uma sequência de 1041 pbs foi obtida da Região Controle de 60 espécimes, que apresentaram 33 sítios polimórficos, 41 haplótipos, $h= 0.978$ e $\pi= 0.009$. Os testes de neutralidade (D and F_s) foram significativos ($P < 0.05$) para a maioria das populações analisadas. A AMOVA indicou que a maior parte da variação molecular (72%) surge entre os grupos. O índice de fixação foi altamente significativo ($F_{ST} = 0.707$, $P = < 0.00001$). As análises filogenéticas indicaram que os espécimes representam um grupo monofilético. Distâncias genéticas entre as populações variaram de 0.8% a 1.9%, e de $<0.5\%$ dentro das populações. O grau de diferenciação genética encontrada entre os estoques de *P. nattereri* indicam a necessidade para o desenvolvimento de planos de manejo independentes para as diferentes bacias hidrográficas, a fim de preservar a variabilidade genética dessas populações.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, Região Controle, Variabilidade, Manejo, Conservação.

Introduction

Piranhas are Neotropical freshwater fishes, member of the order Characiformes a group of some ten families, 240 genera, and 1460 species found predominantly in the New World – from the southwestern United States and Central America to South America – as well as Africa that

present a range of predatory behaviors (Santos et al., 2004; Calcagnotto et al., 2005), specifically the subfamily Serrasalminae, which includes approximately 80 species in 15 genera (Santana et al., 2011). Serrasalmines are present in all the river basins of South America (Oyakawa et al., 2006).

The red piranha, *Pygocentrus nattereri* Kner (1860), is characterized by its oval-shaped body, convex profile, medium size (up to 25 cm), and predominantly dark grayish-silvery coloration, which becomes reddish in the region of the pectoral, ventral, and anal fins. The teeth are resistant, sharp, strong, and dilacerating, which reflects the voracious carnivorous feeding behavior of these fishes (Soares, 2005; Santos et al., 2006). The species is found in a number of different river basins in South America (Queiroz et al., 2010). The ample distribution of the species, its relative abundance, and meaty body contribute to its use as a food by human populations, primarily for soups and sashimi (Barros et al., 2010).

This species is widely distributed in the Brazilian state of Maranhão, which represents an area of transition between the semi-arid region of northeastern Brazil to the east and the exuberant Amazon rainforest to the west, and a complex hydrographic system dominated by perennial rivers such as the Parnaíba, Itapecuru, Mearim, and Pindaré. The Pindaré, Mearim, and Itapecuru form a group of basins typical of the region, with similar topography, and all three discharge into the Gulf of Maranhão, the Mearim/Pindaré into São Marcos Bay, and the Itapecuru in São José Bay. The lower stretches of the Itapecuru and Mearim are characterized by a distinct landscape of meanders and lakes, and the Mearim connects to the Pindaré, which is its principal tributary (Teixeira & Souza-Filho, 2009; Piorski, 2010). The geomorphological evolution of the Gulf of Maranhão reflects the fluctuations in sea level that occurred during the Pliocene and Pleistocene, which culminated in the present-day configuration of estuaries in central Maranhão (Ab'Saber, 1960).

The successful exploitation of the fishery resources available in a river basin depends not only on the understanding of the life cycles of the local species, but also the genetic structure of their populations. Molecular techniques, including sequences of mitochondrial DNA (mtDNA)

have proven especially effective for the evaluation of the genetic diversity of a wide range of fish taxa, and the Control Region has been used for the analysis of the population structure of a large number of species (Santos et al., 2004; Calcagnotto et al., 2005; Fraga et al., 2007; Cheng et al., 2012; Borba et al., 2013).

The taxonomy and systematics of the serrasalmines are subject to a great deal of controversy, and there is considerable disagreement on the position of the subfamily in the Characiformes (Santana et al., 2011). A number of studies have raised questions with regard to the phylogenetic relationships among the species of the genus *Pygocentrus* (Freeman et al., 2007; Hubert et al., 2007; Ortí et al., 2008). Analyzing the phylogeography of *P. nattereri* based on sequences of the Control Region, Torrico (2004) found evidence of population structuring in the specimens from the Madeira River, which formed a distinct group from those collected in the Solimões and Ucayali basins.

Despite its economic and nutritional importance, few data are available on the genetic structure of the *P. nattereri* populations of the river basins of the Brazilian Northeast, and no information whatsoever exists for the state of Maranhão. As the exploitation of fishery stocks without any prior knowledge of their genetic variability may hamper management initiatives and sustainability, the present study investigated the genetic differentiation of the *P. nattereri* populations of the principal river basins of Maranhão, in northeastern Brazil, based on the sequencing of the mitochondrial Control Region.

Material and Methods

Collection and extraction of DNA

A total of 60 *Pygocentrus nattereri* specimens were collected from the basins of the Itapecuru (municipality of Itapecuru-Mirim), Mearim (municipality of Pedreiras), Pindaré (municipality of Pindaré-Mirim), and Parnaíba (municipality of Coelho Neto) rivers in the Brazilian state of Maranhão (Figure 1), with each basin being represented by 15 specimens. The specimens were identified based on the specific literature (Britski et al., 1999; Santos et al., 2004; Soares, 2005; Santos et al., 2006) and confirmed by specialists from the Museum of Zoology at

São Paulo University, MZUSP (vouchers - 104549/104550). All specimens were euthanized by immersion in ice water (Ashley, 2007) and deposited in the collection of the Genetics and molecular Biology Laboratory of Maranhão State University in Caxias. Samples of muscle tissue were extracted from each specimen and conserved in 70% ethanol. The DNA was extracted using the standard phenol-chloroform protocol (Sambrook and Russel, 2001). The collection of specimens was authorized by IBAMA, the Brazilian Federal Environment Institute (license number 02012.004159/2006).

PCR and Sequencing

The mitochondrial Control Region was isolated and amplified using the Polymerase Chain Reaction (PCR) based on the primers D-LoopL1 '5 CTA ACTCCCAAAGCTAGGTATTC3' and D-LoopH1 '5 TGT TTTATCACTGCTGRRTCCCT 3' (Santa Brígida et al., 2007). The PCR was run in a final volume of 25 µl composed of 4 µl of DNTPs (1.25 M), 2.5 µl of buffer solution (10X), 0.5 µl of MgCl₂ solution (50 mM), 1 µl of DNA (250 ng/µl), 0.25 µl of each primer (200 ng/µl), 0.2 µl of the Taq polymerase enzyme (5U/µl), and 16.3 µl of purified water.

The amplification protocol consisted of 3 min at 94°C, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 50°C, 2 min at 72°C, and a final extension of 7 min at 72°C. The PCR products were visualized in a 1% agarose minigel with ethidium bromide and purified with ExoSAP-IT according to the manufacturer's protocol. The sequencing reaction was based on the Sanger et al. (1977) technique, using an ABI Prism™ Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Reading Reaction kit (Applied Biosystems). The samples were precipitated in EDTA/sodium acetate/ethanol and analyzed in an automatic DNA sequencer (ABI 3500/Life Technologies).

Phylogenetic and population analyses

The sequences were edited in Bioedit 7.0 (Hall, 1999) and aligned using the Clustal W 1.4 tool (Thompson et al., 1994). Two sequences of the Control Region of *Pygocentrus nattereri* deposited in the Genbank (AF283953 - Ortí et al., 2008 e AP012000 - Nakatani et al., 2011) were used as a reference for the alignment. The most adequate evolutionary model for the dataset was identified by JmodelTest 2 (Darriba et al., 2012). Tamura's (1992) T92+G+I model was selected

for the construction of the trees using the Akaike Information Criterion (AIC), with the parameters being derived from Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) approaches. The phylogenetic analyses Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) were run in PHYML 3.0 (Guindon et al., 2010). The significance of the groupings produced by these analyses was tested by bootstrap analysis with 1000 pseudoreplicates (Felsenstein, 1985). Sequences of *Metynnis hypsauchen* (D-Loop AF283957 - Ortí et al., 2008) and *Metynnis* sp. (D-Loop AF283956 - Ortí et al., 2008) were used as the outgroup.

The haplotype and nucleotide diversity indices were obtained from DNAsp 5.1 (Librado and Rozas, 2009), and the haplotype network was generated by Haploviewer software (Salzburger et al., 2011), using the Maximum Likelihood, in PHYML 3.0 (Guindon et al., 2010)). Evidence of selective neutrality in the populations was gleaned from the D (Tajima, 1989) and F_S tests (Fu, 1997). The possible existence of differentiated populations and the significance of inter- and intra-population variability were verified using an Analysis of Molecular Variance (AMOVA). Five different AMOVAs were run, four of which included only the populations from Maranhão, and a fifth that included 30 sequences of the Control Region of *P. nattereri* obtained from Genbank, representing populations from the basin of the Amazon River (Amazonas, Brazil) – KC132013/ KC131975-79 (Thompson et al., 2012), DQ384773-75 e DQ384781-83 (Hubert et al., 2007), AP012000 (Nakatani et al., 2011) and AF283953 (Ortí et al., 2008), the Madeira River (Amazonas, Brazil) – DQ384764-72 (Hubert et al., 2007), the Paraná River (Paraná, Brazil) – DQ384776-80 (Hubert et al., 2007), and the São Francisco River (Bahia, Brazil) – DQ384784-85 (Hubert et al., 2007). The fixation index (F_{ST}) and its significance were obtained from 1023 random permutations. The neutrality tests of AMOVA and fixation indices were obtained in the Arlequin 3.5 program (Excoffier and Lischer, 2010). Possible population groups were identified in BAPS 6.0 using the Bayesian grouping analysis described by Corander et al. (2013). The nucleotide divergence indices were determined by the uncorrected p distances and the corrected Tamura and Nei (1993) parameters in Mega 6.0 (Tamura et al., 2013) considering the groups generated in the BAPS analysis.

Results

The amplification of the Control Region of the 60 *Pygocentrus nattereri* specimens generated a sequence of 1039 base pairs. The mean nucleotide composition of these sequences was 29.8% Thymine, 23.4% Cytosine, 30.6% Adenine, and 16.2% Guanine. A total of 33 polymorphic sites and 41 haplotypes were identified, with a general haplotype diversity of 0.978 and nucleotide diversity of 0.009. High levels of haplotype diversity were found in each of the populations analyzed (Table 1).

Overall, 32 of the 41 haplotypes identified in the analyses were unique and exclusive. Of these, seven (H2–H5 and H7–H9) were from the Parnaíba basin, 12 (H10–H21) were from the Itapecuru, eight (H23, H24, H28–H32, and H34) were from the Mearim, and the remaining five (H36–H39 and H41) were from the Pindaré. The most common haplotype was H6, which was recorded six times and was found in both the Parnaíba and Itapecuru basins. The second most common haplotype was H1, which was exclusive to the Parnaíba, with five records. The third most common haplotype was H26, with a total of four records from the Mearim and Pindaré basins, while the fourth most common was also found in these two basins, with a total of three records. Three other haplotypes – H22, H27, and H33 – were also recorded from these two basins, with one record from each. The other haplotypes with two records – H35 and H40 – were exclusive to the Pindaré River (Figure 2).

The haplotype network (Figure 2) revealed a higher degree of similarity between the specimens from the Parnaíba and Itapecuru basins, even though one group of haplotypes from the Parnaíba is separated from the Itapecuru by three mutation events. The specimens from the Mearim and Pindaré basins were also highly similar, and were differentiated from the Parnaíba and Itapecuru populations by 12 mutations. These findings were further reinforced by the analyses of genetic distance (p distance, and Tamura and Nei), with distances of up to 1.9% between the Parnaíba population and that of Mearim-Pindaré, and 1.4% between Itapecuru, Mearim-Pindaré.

The results of the neutrality tests – Tajima's D and Fu's F_S – were significant ($P < 0.05$) for the majority of the populations (except for the Parnaíba River – $F_S = -0.976$, $P = 0.283$) when analyzed together or separately (Table 1). This indicates that the hypothesis of neutral polymorphism can be rejected, and suggests that the populations passed through a recent process of expansion.

The patterns of genetic variability found within and between populations in the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) were based on the three principal clusters, i.e., Parnaíba, Itapecuru, and Mearim/Pindaré. The AMOVA indicated that 72% of the molecular variation was found among groups, with only 28% being found within populations. The F_{ST} value was 0.707, and highly significant ($p < 0.00001$), indicating the existence of genetic structuring among the study populations (Table 2). When the populations were considered as a single group, the differentiation among populations was 68%, and the F_{ST} value (0.667) was still highly significant ($p < 0.00001$). Three other simulations were run on the Maranhão populations (Parnaíba vs. Mearim-Pindaré, Itapecuru vs. Mearim-Pindaré and Parnaíba, Itapecuru vs. Mearim-Pindaré), and the results were always $F_{ST} < 0.70$ with $p < 0.00001$.

The results of the AMOVA that included the 30 *P. nattereri* sequences obtained from Genbank, and tested the hierarchy of three groups – North (Amazon and Madeira basins), South (Paraná River), and Northeast (Parnaíba, Itapecuru, Mearim, Pindaré and São Francisco basins) – found that most (46%) of the molecular variation is found among populations of the same region. The F_{ST} value was 0.716, with a highly significant p (< 0.00001), indicating the existence of a high degree of genetic structuring among populations (Table 2).

The phylogenetic analyses were based on two different approaches – ML and NJ – in order to estimate the most likely topology of the evolutionary history of the *P. nattereri* populations in the study area. Both methods produced highly similar topologies, grouping the specimens with 100% bootstrap values. The different phylogenetic approaches (Figure 3) also revealed the existence of three distinct groups formed by the specimens from the Parnaíba basin (ML and NJ

with 85% bootstrap values), samples from the Parnaíba and Itapecuru rivers (ML = 69%, NJ = 84%), and specimens from the Itapecuru, Mearim, and Pindaré basins (ML = 92%, NJ = 95%).

The population groupings generated by the BAPS analysis, based on Bayesian inference, revealed the existence of three groups or clusters (Parnaíba, Itapecuru, and Mearim-Pindaré), with the greatest distance being found between the Parnaíba and Mearim-Pindaré groups, with a divergence of 1.9% (Figure 4, Table 3). The smallest divergence (0.8%) was found between the Parnaíba and Itapecuru groups, while within-population differentiation was invariably less than 0.5% (Table 3).

Discussion

In the present study, the estimates of polymorphism in *Pygocentrus nattereri* indicated high levels of genetic variability in the river basins analyzed. Haplotype diversity was high considering the populations either as a group ($h = 0.978$) or individually. The genetic variability of a population may determine its capacity to adapt to changes in the environment, reproductive success and growth rates and, ultimately, its chances of survival over the long term (Frankham et al., 2002).

The haplotype network indicated a greater genetic similarity between the specimens from the Mearim and Pindaré basins, emphasized by the largest number of shared haplotypes (five). This marked similarity between the basins was further emphasized by the results of the BAPS analysis, with the two groups being included in a single cluster. The genetic proximity between the specimens from these two basins may be a result of their geomorphological similarities, and not least because the Pindaré is the principal tributary of the Mearim (Teixeira and Souza-Filho, 2009; Piorski, 2010).

The neutrality tests – D (Tajima, 1989) and F_S (Fu, 1997) – were significant ($P < 0.05$) for most populations, indicating that they may have passed through a recent process of expansion. This conclusion is supported by the large number of unique haplotypes found in these populations, given that rapid population growth favors the retention of new mutations (Avisé et al., 1994).

The results of the AMOVA indicated that the majority (72%) of the genetic variation was related to differences among the groups. The highly significant F_{ST} value (0.707; $p < 0.00001$) indicated that the *P. nattereri* populations are genetically structured. A similar pattern was observed in the populations from the Northern, Northeastern and Southern regions ($F_{ST} = 0.716$; $p < 0.00001$). Defining genetic variation at the population level is essential for the understanding of the distribution of this diversity within the species. When this variation is continuous, any given area within its geographic range should be representative of the species, whereas genetic structuring indicates the need to consider each subpopulation as a separate unit (Terencio, 2009).

The phylogenetic analyses based on the different analytical approaches (ML and NJ) and with bootstrap values of 99 – 100%, indicated the existence of three distinct groups (Parnaíba, Itapecuru-Parnaíba, and Mearim-Pindaré). The concept of evolutionary units refers to the definition of a population or group of populations differentiated genetically, morphologically or ecologically from neighboring conspecific populations, reflecting a historical process of geographic isolation on some level. As they present distinct characteristics, these groups should be treated as independent units for conservation purposes (Terencio, 2009). Torrico (2004) reported that the *P. nattereri* specimens from the upper Madeira, Solimões, and Ucayali Rivers grouped together with a 100% bootstrap value. Ortí et al. (2008) also confirmed the monophyly of the serrasalmines based on an analysis of the mitochondrial Control Region. Similar results were obtained using this marker for the serrasalmine genera *Serrasalmus* (Hubert et al., 2007) and *Pygocentrus* (Freeman et al., 2007).

The highest genetic divergence indices between populations were found between Parnaíba and Mearim/Pindaré (1.9%). Low levels of divergence ($< 0.5\%$) were found within the populations analyzed. Hubert et al. (2007) recorded genetic distances of 1.2% and 3.0% between serrasalmine species, and distances of 0.1% to 0.8% between populations of the same species. In a phylogeographic study of *P. nattereri*, Torrico (2004) recorded divergence values of between 0.29% and 1.12% for specimens from the Madeira, Ucayali, and Solimões river basins.

Analyzing the Control Region, Ortí et al. (2008) recorded genetic distances of 0.017% to 0.256% between serrasalmine species.

The definition of biological parameters is extremely important for the development of adequate procedures for the management of natural resources, such as fishery stocks. Studies of genetic variability, principally those based on polymorphisms of mitochondrial DNA, provide a strong scientific baseline for the development of conservation and management programs (Batista, 2010).

In the present study, the results of the analysis of the Control Region provided important insights into the genetic variability of the *Pygocentrus nattereri* populations of the study area, and in particular, their structuring among the different river basins revealed consistently by the different analytical approaches, all of which supported the presence of three distinct groups (Parnaíba, Itapecuru, and Mearim-Pindaré). These findings will be important for the development of effective conservation and management policies, which should treat each basin separately, given the genetic differences found between them.

Acknowledgements

We are grateful to the Bank of Northeastern Brazil (BNB) and the Maranhão State Scientific and Technological Development Foundation (FAPEMA) for financial support. We would also like to thank Luís Fernando Silva Rodrigues, a post-doctoral fellow at the Institute of Coastal Studies at UFPA/Bragança campus for conducting the analyses.

References

- AVISE, JC., NEIGEL, JE. and ARNOLD, J., 1994. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, vol. 20, p. 99-105.
- AB'SÁBER, AN., 1960. Contribuições à Geomorfologia do Estado do Maranhão. Transcrito do "Anuário da Faculdade de Filosofia". Universidade Católica de São Paulo. vol.13. p. 35-49.
- ASHLEY, PJ., 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, Amsterdam, vol. 104, p. 199-235.

- BARROS, LA., MATEUS, LAF., BRAUM, DT and BONALDO, J., 2010. Aspectos ecológicos de endoparasitos de piranha vermelha (*Pygocentrus nattereri*, Kner 1860) proveniente do rio Cuiabá. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 62, no. 1, p. 228-231.
- BATISTA, JS., 2010. 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. Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA. 128 p. Tese de Doutorado em Conservação e Biologia Evolutiva.
- BORBA, RS., SILVA, EL., PONZETTO, JM., POZZOBON, APB., CENTOFANTE, L., ALVES, A.L and PARISE-MALTEMP, PP., 2013. Genetic structure of the ornamental tetra fish species *Piabucus melanostomus* Holmberg, 1891 (Characidae, Iguanodectinae) in the Brazilian Pantanal wetlands inferred by mitochondrial DNA sequences. *Biota Neotropical*, vol. 13, no. 1, p. 42-46.
- BRITSKI, HA., SILIMON, KZS., LOPES, BS., 1999. Peixes do Pantanal. Manual de Identificação. Embrapa Corumbá-SP. 184 p.
- CALCAGNOTTO, D., SCHAEFE, SA. and DESALLE, R., 2005. Relationships among Characiformes fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol 36, p. 135-153.
- CARVALHO, LRM., BRAVO, JP., VALLE, JSL., GASQUES, S., LINDE, G.A, FERNANDEZ MA. and COLAUTO, NB., 2008. Amplificação por PCR da região controle do DNA mitocondrial de raças de *Bombyxmori*. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*, vol. 11, no. 1, p. 15-19.
- CHENG, YZ., XU, TJ., JIN, XX., TANG, D., WEI, T., SUN, YY., MENG, FQ., SHI, G. and WANG, RX., 2012. Universal primers for amplification of the complete mitochondrial control region in marine fish species. *Molecular Biology*, vol 46, no. 5, p. 727-730.
- CORANDER, J., CHENG, L., MARTTINEN, P., SIRÉN, J. and TANG, J. 2013. BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure. Version 6.0.

- DARRIBA, D., TABOADA, GL., DOALLO, R. and POSADA, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, vol.9 no.8.
- EXCOFFIER, L. and LISCHER, HEL., 2010. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, vol. 10, no. 3, p. 564-567.
- FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, vol. 39, no. 4, p. 783-791.
- FRAGA, E., SCHNEIDER, H., NIRCHIO, M., SANTA-BRIGIDA, E., RODRIGUES-FILHO, LF. and SAMPAIO, I., 2007. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *Journal Applied Ichthyology*, vol. 23, no. 5, p. 598-604.
- FRANKHAM, R., BALLOU, JR. and BRISCOE, DA., 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Cambridge, England. 640 p.
- FREEMAN, B., NICO, LG., OSENTOSKI, M. and COLLINS, HL., 2007. Molecular systematic of Serrasalminae: Deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. *Zootaxa*, vol. 1484, p. 1-38.
- FU, YX., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth hitchhiking and background selection. *Genetics*, vol. 1447, p. 915-925.
- GUINDON, S., DUFAYARD, JF., LEFORT, V., ANISIMOVA, M. and HORDIJK, W., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, vol. 59, p. 307-321.
- HALL, TA., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, p. 95-98.
- HUBERT, N., DUPONCHELLE, F., NUÑEZ, J., da VILA, CG., PAUGY, D. and RENNO, JF., 2007. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, vol. 16, no. 10, p. 2115-2136.

- LIBRADO, P. and ROZAS, J., 2009. DNAsp v5: A software for comprehensive analyses of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- NAKATANI, M., MIYA, M., MABUCHI, K., SAITOH, K. and NISHIDA, M., 2011. Evolutionary history of *Otophysi* (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeian origin and Mesozoic radiation. *Evolutionary Biology*, vol. 11, no. 1, p. 11-177.
- ORTÍ, G., SIVASUNDAR, A., Dietz, K., and JÉGU, M., 2008. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 31, no. 1, p. 343-351.
- OYAKAWA, OT., AKAMA, A., MAUTARI, CK. and NOLASCO, CJ., 2006. Peixes de riachos da Mata Atlântica nas unidades de conservação do Vale do Rio Ribeiro de Iguarapé no estado de São Paulo. São Paulo, Neotrópica.
- PIORSKI, NM., 2010. Diversidade genética e filogeografia das espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos-UFSC. 153 p. Tese de Doutorado em Genética e Evolução.
- QUEIROZ, HL., SOBANSKI, MB., MAGURRAN, AE., QUEIROZ, HL., 2010. Reproductive strategies of Red-bellied Piranha (*Pygocentrus nattereri* Kner, 1858) in the white waters of the Mamirauá flooded forest, central Brazilian Amazon. *Environmental Biology of Fishes*, vol. 89, no. 1, p. 11-19.
- SALZBURGER, W., EWING, GB. and Von HAESELER, A., 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, 20: 1952-1963.
- SAMBROOK, J. and RUSSEL, DW., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory press. Cold Spring Harbor, New York.
- SANGER, F., S. NICHLEN and A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 74, p. 5463-5468.

- SANTA BRÍGIDA, EL., CUNHA, DB., REGO, OS., SAMPAIO, I., SCHNEIDER, H. and VALLINOTO, M., 2007. Population analysis of *Scomberomorus cavalla* (Perciformes, Scombridae) from the Northern and Northeastern coast of Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 67, p. 919-924.
- SANTANA, MP., GIONGO, P., TRAVENZOLI, NM, WALKER, NJ. and SAMPAIO, WMS., 2011. Diversidade cariotípica da piranha vermelha *Pygocentrus nattereri* (Characiformes, Characidae) rio Salobo, bacia do Araguaia, Pará, Brasil. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, vol. 2., no. 1, p. 98-103.
- SANTOS, GM., MÉRONA, B., JURAS, AA. and JÉGU, M., 2004. Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí. Eletronorte, Brasília. 216 p.
- SANTOS, GM., Ferreira, E. and ZUANON, J., 2006. Peixes Comerciais de Manaus. 2 ed. Manaus, Ibama-ProVárzea.
- SOARES, EC., 2005. Peixes do Mearim. São Luís, Instituto Geia. 142 p.
- TAJIMA, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, vol. 123, no. 3, p. 585-595.
- TAMURA, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content bases. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 9, no. 4 p. 678-687.
- TAMURA, K. and NEI, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 10, no. 3, p. 512-526.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. and KUMAR, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- TEIXEIRA, SG, SOUZA-FILHO, PWM., 2009. Mapeamento de ambientes costeiros tropicais (golfão Maranhense, Brasil) utilizando imagens de sensores remotos orbitais. *Revista Brasileira de Geofísica*, vol. 27, no. 1, p.69-82.

- TERENCIO, ML., 2009. Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA mitocondrial de *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) da bacia do rio Negro. Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA. 86 p. Dissertação de mestrado em Conservação e Biologia Evolutiva.
- THOMPSON, AW., BETANCUR, RR. and ORTI, G., 2012. A Multi-locus Phylogeny of Piranhas, Pacus, and Allies (Teleostei: Characiformes: Serrasalminae) and a Comparison of species Tree Methods. *Biological Sciences*, George Washington University, Washington, USA.
- THOMPSON, JD., HIGGINS, DJ. and GIBSON, TJ., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, vol. 22, no. 22, p. 4673–4680.
- TORRICO, JP., 2004. Filogeografía comparada de siete especies de peces de agua dulce del Alto Madeira (Amazonía Boliviana). Bolívia: Universidad Mayor de San Andrés. 95 p. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas y Biomédicas.

Table 1 - Levels of genetic diversity and the results of the neutrality tests for the populations of *Pygocentrus nattereri* from the Brazilian state of Maranhão analyzed in the present study, based on sequences of the mitochondrial Control Region.

Population	N	NH	S	Index of molecular diversity		Neutrality tests		
				<i>h</i>	π	<i>D</i>	F_S	<i>P</i>
Parnaíba river	15	09	14	0.876	0.005	0.840	-0.976	0.283
Itapecuru river	15	13	18	0.971	0.005	-0.022	-6.072	0.001
Mearim river	15	13	09	0.981	0.002	-0.008	-10.55	0.000
Pindaré river	15	12	09	0.971	0.002	-0.188	-8.503	0.000
Total	60	41	33	0.978	0.009	0.155	-6.527	0.071

N = sample size; NH = number of haplotypes, S = polymorphic sites; *h* = haplotype diversity, π = nucleotide diversity, *D* = Tajima's index, F_S = Fu's index, and *P* = significance of the F_S value. Significance level ($P < 0.05$).

Table 2 - Results of the AMOVA for the populations of *Pygocentrus nattereri* obtained for the sequences of the mitochondrial Control Region.

Type of variation	Component of the variation	% of the total variation	F_{ST}	<i>P</i>
<i>Clusters: Parnaíba, Itapecuru and Mearim-Pindaré</i>				
Between groups	4.932	72	0.707	<0.00001
Between populations of the same groups	-0.072	-1		
Within populations	2.014	29		
<i>Groups: North, South and Northeast</i>				
Between groups	129.617	26	0.717	<0.00001
Between populations of the same groups	189.116	46		
Within populations	154.667	28		

Significance level ($P < 0.05$).

Table 3 - Mean nucleotide divergence (percentage) among *Pygocentrus nattereri* populations from the Brazilian state of Maranhão based on *p* (below the diagonal) and Tamura and Nei (above the diagonal) distances.

Population	% Inter-population divergence			% Intra-population divergence
	Parnaíba	Itapecuru	Mearim-Pindaré	
Parnaíba		0.8	1.9	0.3
Itapecuru	0.8		1.5	0.2
Mearim-Pindaré	1.9	1.4		0.3

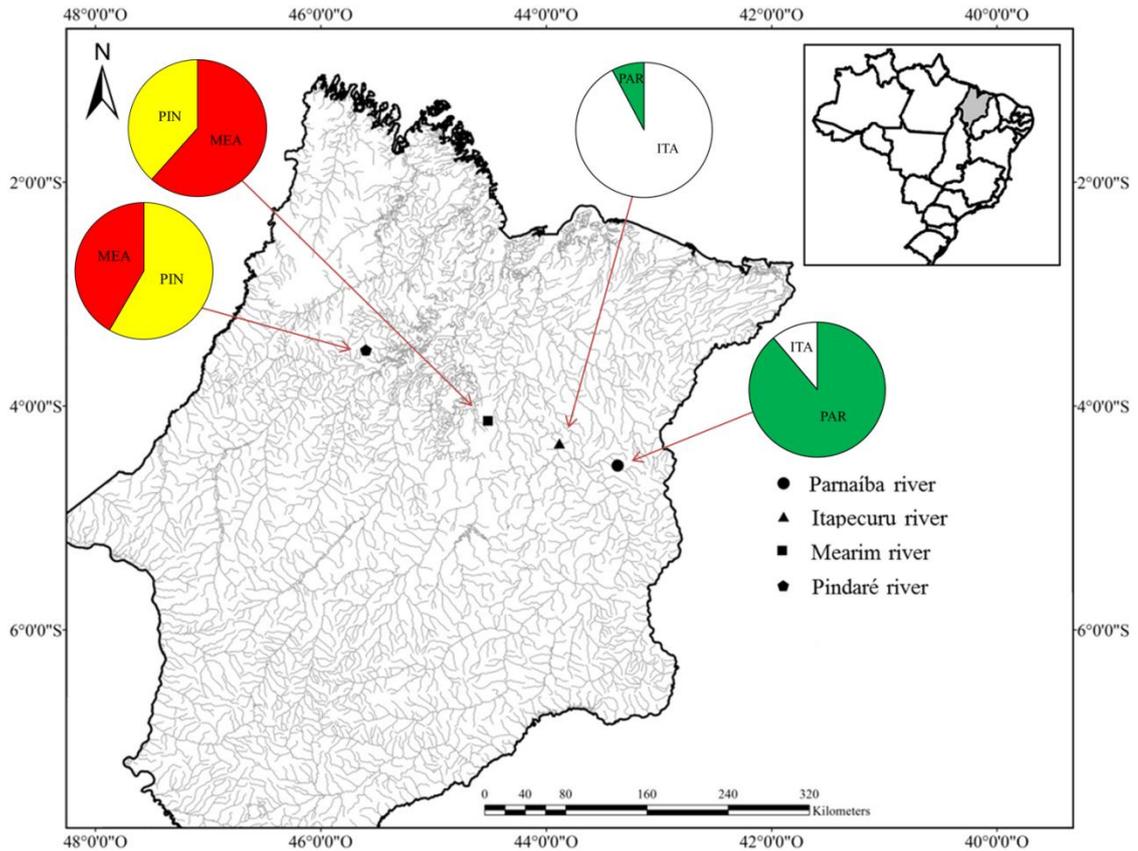


Figure 1 - Location of the river basins in the Brazilian state of Maranhão in which the specimens of *Pygocentrus nattereri* were collected for analysis in the present study. The circles represent the proportion of the haplotypes shared between basins. PAR = Parnaíba, ITA = Itapecuru, MEA = Mearim, and PIN = Pindaré.

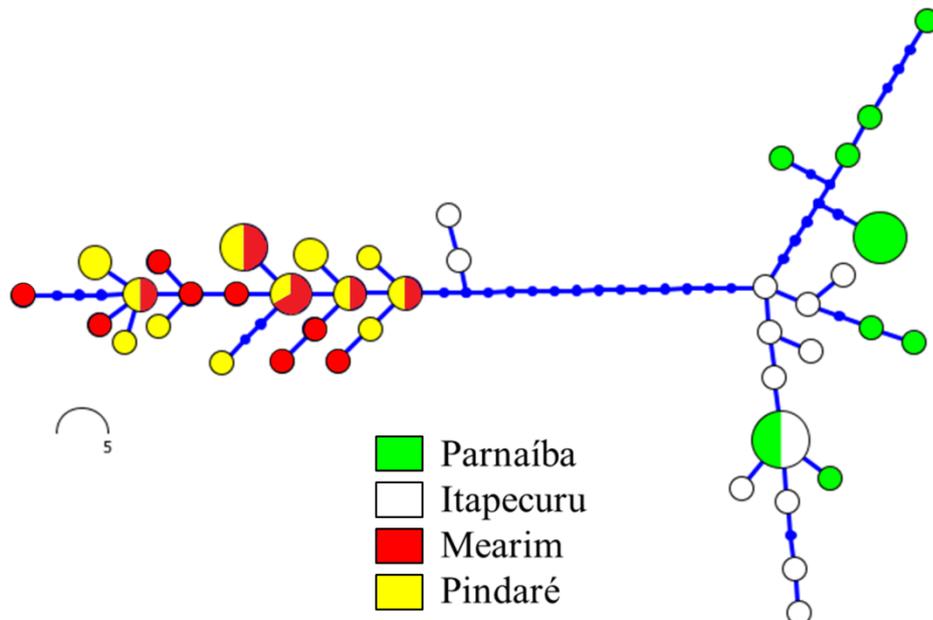


Figure 2—Haplotype network based on a maximum likelihood analysis of the sequences of the mitochondrial Control Region. Each haplotype is represented by a circle (the size of which is proportional to its total frequency in the populations) with the different colors representing each of the study populations.

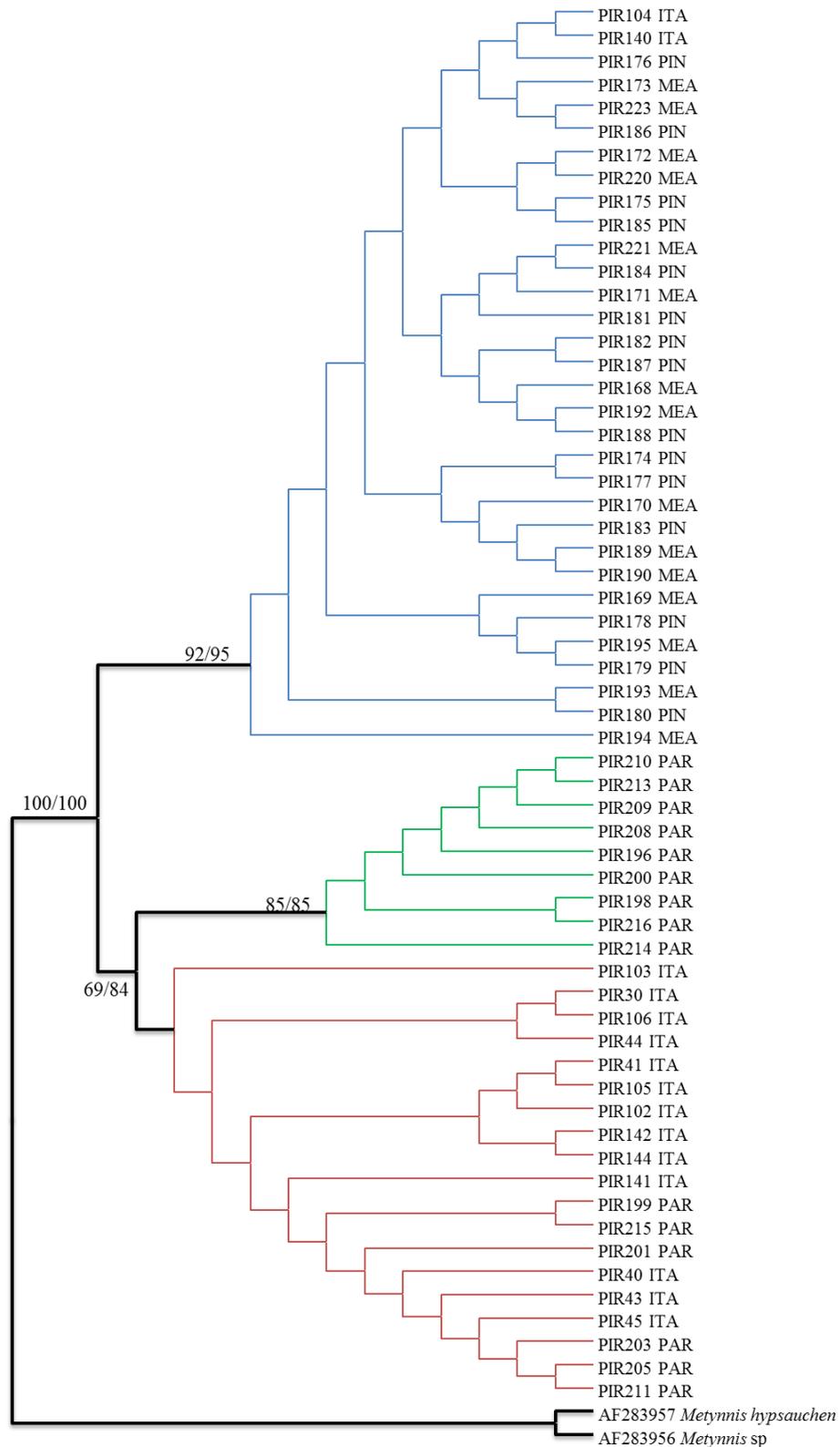


Figure 3 - Phylogenetic tree derived from 1000 bootstrap replicates based on the Tamura (1992) model. The numbers above the branches represent the bootstrap values for the Maximum Likelihood/Neighbor-Joining approaches, respectively. PAR = Parnaíba, ITA = Itapecuru, MEA = Mearim, and PIN = Pindaré.

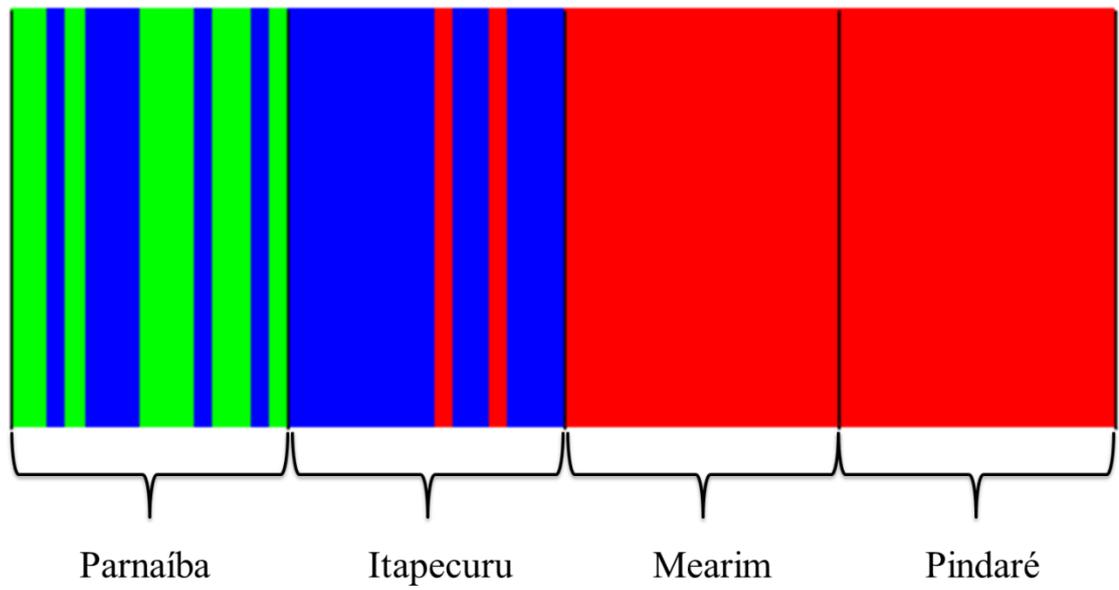


Figure 4 – *A priori* estimate of the probable groups of populations produced by the BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure v 6.0) program, indicating a total of three groups.