

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**

PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS NATURAIS

**Filogeografia de *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841
(Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na região Amazônica.**

RENATA GUIMARÃES FREDERICO

Dissertação apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Ecologia

MANAUS – AM

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**

PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS NATURAIS

**Filogeografia de *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841
(Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na região Amazônica**

RENATA GUIMARÃES FREDERICO

Orientador: José A. Alves Gomes

Dissertação apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Ecologia

MANAUS – AM

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

F852 Frederico, Renata Guimarães

Filogeografia de *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841
(Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na região Amazônica. / Renata
Guimarães Frederico.--- Manaus : [s.n.], 2006.
p.64 : il.

Dissertação (mestrado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2006
Orientador : Gomes, José Antônio Alves
Área de concentração : Ecologia
1. Raias de água doce. 2. DNA mitocondrial e conservação.
I. Título.

CDD 597.35

Sinopse:

As raias de água doce pertencem à família Potamotrygonidae sendo exclusivas da região Neotropical. Essa família possui três gêneros válidos, *Paratrygon*, *Poyamotrygon* e *Plesiotrygon*. *Paratrygon aiereba* é uma das três espécies da família Potamotrygonidae que possui uma ampla distribuição, ocorrendo na Bacia Amazônica e do Orinoco, assim, foram estudadas geneticamente populações dos rios Negro, Solimões-Amazonas, Tapajós, Xingu, Araguaia. Os resultados mostraram que estas populações estão estruturadas dentro dos rios, não apresentando fluxo gênico, ou este é restrito, estando separadas geograficamente e possuem uma alta diversidade genética.

Palavras-chave: raias de água doce, DNA mitocondrial e conservação

*Aos meus pais Lealis e Romano e ao meu irmão Marcelo
pelo amor e força incondicionais*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, meus pais Romano Frederico e Lealis Guimarães e meu irmão Marcelo por sempre terem me incentivado a acreditar nos meus sonhos e me apoiado para a realização deles, pelo amor incondicional e por todo carinho em todos os momentos.

Ao Caê que nesse último ano tem sido meu porto seguro, por todo amor, carinho e cumplicidade, meu grande amigo, meu grande amor.

Ao Dr. José A. Alves Gomes por ter me aceitado orientar e ter viabilizado a realização deste trabalho.

À Maria Lucia Araújo pelos ensinamentos no campo, sobre o mundo das raias de água doce e colaboração com o trabalho.

Aos colaboradores Fernando Marques e Patrícia Charvet-Almeida, pois sem eles esse trabalho não teria sido realizado, além de ceder amostras de tecido, sempre me incentivaram dando valiosas contribuições.

Aos Dr. Jansen Zuanon, Dr. Jorge Porto, Dr. Márcio Oliveira e Dra Izeni Farias pela ajuda e contribuições.

Ao projeto PIRADA, FAPEAM, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Ao INPA, Divisão dos Cursos de Pós-Graduação, Coordenações de Pesquisas em Ecologia e às funcionárias Geize, Luiza pelas valiosas contribuições aos alunos da Pós-Graduação.

À Jacqueline Batista, Kyara Formiga e a todos do Laboratório Temático de Biologia Molecular, pela ajuda e sugestões para a realização desse trabalho.

Aos amigos da UEL que estão pelo Brasil, Tati, Marise, Josi, Amanda, Dani e aos que passaram ou ainda estão aqui em Manaus Juju, Fabrício, Caio, Carlota, Sol, Dri, Pedro, Waleska.

A Renata e Mary pelos ensinamentos, ajuda, amizade e confiança, sensibilidade.

A todos do Laboratório de Fisiologia Comportamental, David, Adília, Gisa, Rômulo, Cristiano, Isabel pela convivência e amizade.

A Ju Stropp pela amizade, carinho e torcida.

Ao Cleiton que sempre esteve perto em todos os momentos, grande amigo de todas as horas.

A Su, Robin, Maria e Grazi por terem me acolhido e me ajudado, por todo carinho, principalmente nesses últimos meses.

Aos queridos amigos que surgiram nesses últimos dois anos, pessoas incríveis.

Aos queridos amigos da turma de 2004: Sol, Dri, Fafinha, Emiliano, Santi, Tony, Tatá, Pedro, Lalá, Grazi, Saci, Gabi, Trupico, Anselmo.

Aos amigos do mestrado e doutorado pelas conversas enriquecedoras.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram muito para que este estudo fosse possível.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS _____	ix
LISTA DE TABELAS _____	xi
RESUMO _____	xiii
ABSTRACT _____	xv
1. INTRODUÇÃO _____	01
2. OBJETIVOS _____	10
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	10
3. MATERIAL E MÉTODOS _____	11
3.1. ÁREA DE ESTUDO _____	11
3.2. AMOSTRAGEM _____	14
3.3. MARCADOR MOLECULAR _____	15
3.4. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS _____	16
3.4.1. Extração _____	16
3.4.2. Amplificação e seqüenciamento _____	17
3.5. ANÁLISES DAS SEQÜÊNCIAS _____	20
4. RESULTADOS _____	23
4.1. <i>D-Loop</i> _____	23
4.2. ATPASE _____	29
5. DISCUSSÃO _____	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	49
ANEXOS _____	59
ANEXO 1 _____	60
ANEXO 2 _____	61
ANEXO 3 _____	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regiões Biogeográficas propostas por Wallace em 1876. _____	02
Figura 2 - Mapa ilustrando como ocorreram as incursões marinha no início do período do Mioceno (20 a 11,8 Milhões de anos). Lundberg <i>et al.</i> , 1998. _____	05
Figura 3 - Mapa hidrográfico da América do Sul, em destaque, os rios Orinoco e Amazonas. _____	07
Figura 4 - Espécie <i>Paratrygon aiereba</i> , coletada no Rio Negro. (Foto: M.L. Araújo). _____	08
Figura 5 - Mapa ilustrando como ocorreram as incursões marinha no período do Eoceno (Terciário 60 a 43 Milhões de anos). Lundberg <i>et al.</i> , 1998. _	09
Figura 6 - Mapa da Amazônia Legal e em destaque os rios onde foram coletados os espécimens de <i>P. aiereba</i> para esse estudo. Círculos vermelhos indicam a região onde os espécimens foram coletados. _____	13
Figura 7 - Esquema do DNA mitocondrial em peixes, destacando a região <i>D-Loop</i> e ATPase, subunidades 6 e 8. _____	16
Figura 8 - Esquema da localização dos <i>primers</i> em <i>P. aiereba</i> . CB3R - <i>primer</i> universal localizado no citocromo B, PHE – <i>primer</i> desenhado por F. Marques, localizado no final da fenilalanina e final do <i>D-loop</i> e TPA-F – <i>primer</i> desenhado neste estudo, adjacente ao início da região <i>D-loop</i> . ____	18
Figura 9 - Esquema da localização dos <i>primers</i> em <i>P. aiereba</i> . PotaATPf2_Lys e PotaATPr2 – <i>primers</i> usados para amplificação, PotaATP_F3 e ATP_r – <i>primers</i> usados para o seqüenciamento. _____	20

- Figura 10 - Esquema da porção *D-Loop*. Onde fita L, representa o início do fragmento com 700pb seqüenciados, H é o final da fita também com 700pb seqüenciados, e a porção em vermelho faltou ser seqüenciada. _ 24
- Figura 11 - Árvore de haplótipos do fragmento de *D-Loop* de *P. aiereba*, fita L e H, nos rios Negro, Araguaia e Xingu. A – fita L, início do fragmento. B – final do fragmento. Onde“-“= *missing data*. Rio Negro = Laranja, rio Xingu = Verde e rio Araguaia = Azul. _____ 27
- Figura 12 - Árvore de máxima parcimônia (*D-Loop*) fitas L e H de *P. aiereba*. A – fita L. B – fita H. Número dos ramos correspondem aos valores de Boostrap. _____ 28
- Figura 13 - Árvores de haplótipos de *P. aiereba* geradas para o fragmento de ATPase, onde cada cor corresponde ao rio indicado pelo haplótipo. Calha = Amarelo, Rio Negro = Laranja, rio Tapajós = Verde, rio Xingu = Azul escuro, Araguaia = Azul claro. _____ 33
- Figura 14 - Árvore de máxima verossimilhança gerada a partir do modelo evolutivo de HKY+G para o fragmento de ATPase de *P. aiereba*.____ 34
- Figura 15 - Árvore de máxima parcimônia gerada para o fragmento de ATPase em *Paratrygon aiereba*, números acima dos ramos são os valores de boostrap. _____ 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação da região <i>D-Loop</i> e ATPase de <i>Paratrygon aiereba</i> . _____	18
Tabela 2 - Número de seqüências por haplótipos encontrados para a região <i>D-Loop forward</i> (L) e reversa (H) separadamente de <i>P. aiereba</i> . _____	25
Tabela 3 - Valores percentuais (média \pm desvio padrão) da divergência genética “p”, dentro e entre populações de <i>P. aiereba</i> dos rios Araguaia e Negro. _____	29
Tabela 4 - Variabilidade genética do <i>D-Loop</i> L e H, por localidade de coleta. N - número de seqüências, H - número de haplótipos, S - número de sítios polimórficos, Hd – diversidade genética, SD – desvio padrão e π – diversidade nucleotídica. _____	29
Tabela 5 - Número de seqüências por haplótipos para o fragmento de ATPase subunidades 6 e 8 em indivíduos de <i>P. aiereba</i> . _____	30
Tabela 6 - Divergência genética entre os haplótipos encontrados para cada localidade amostrada para <i>P. aiereba</i> . _____	37
Tabela 7 - Valores médios percentuais de média \pm desvio padrão da distância “p” para ATPase dentro e entre as populações de <i>P. aiereba</i> . _____	40
Tabela 8 - Índices de Polimorfismos de DNA para o fragmento de ATPase em populações de <i>P. aiereba</i> . N-número de seqüências, nH – número de haplótipos, S – sítios polimórficos, Hd – diversidade genética, π – diversidade nucleotídica. _____	41
Tabela 9 - Valores de F_{st} abaixo e Nm acima encontrados entre as populações. * indica valores significativos de acordo com a correção de Bonferroni ($P \leq 0,005$). _____	41

RESUMO

A filogeografia é o segmento da biogeografia que consiste no estudo dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genéticas. Através de estudos filogeográficos, é possível a investigação de processos populacionais e modelos regionais que interferem na diversidade e distribuição das populações. Além de gerar subsídios sobre a conservação dos organismos, pois a diversidade das espécies representa o alcance das adaptações evolutivas e ecológicas em relação a determinados ambientes. As raias fazem parte da Classe Chondrichthyes, grupo de peixes cartilagosos, subclasse Elasmobranchii. Dentro desse grupo a única linhagem exclusiva de água doce, com ciclo de vida completo em águas continentais, está contido na família Potamotrygonidae, que ocorre exclusivamente na região Neotropical, México e América do Sul. A família Potamotrygonidae forma um clado monofilético com três gêneros: *Paratrygon* Duméril, *Potamotrygon* Garman e *Plesiotrygon* Rosa, Castello & Thorson. A maioria das espécies dessa família possui distribuição restrita a uma única bacia ou sistema fluvial, e somente as espécies *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Paratrygon aiereba* estão presentes em mais de uma bacia. O presente estudo teve como objetivo investigar a estrutura genética de *Paratrygon aiereba* em alguns rios da região Amazônica: Negro, sistema Solimões-Amazonas, Tapajós, Xingu, e Araguaia. Para tal foi utilizado como marcador molecular os genes das subunidades 6 e 8 da ATPase e D-Loop localizados no DNA mitocôndrial de *Paratrygon aiereba*. Os resultados desse trabalho mostraram que essas populações estão estruturadas dentro dos rios, com fluxo gênico restrito, ou mesmo sem fluxo gênico, apresentando uma correlação positiva entre distância genética e distância geográfica. A população do rio Araguaia apresentou a maior divergência genética, o que pode ser consequência desse isolamento geográfico que pode datar período do Mioceno. Foi nesse período que

houve o soerguimento dos Andes e a modelagem da bacia amazônica como ela é hoje. Assim, a separação dessas populações pode ter ocorrido nesse mesmo período. Apesar dessas populações estarem isoladas, elas ainda possuem uma alta diversidade genética, que pode ser perdida na ocorrência de pressões antrópicas. O Rio Negro é conhecido por sua pesca ornamental, e na calha Solimões-Amazonas, esses animais são utilizados como fonte de proteína e sofrem com a pesca comercial. Em vista disso medidas de conservação para esta espécie devem ser tomadas em nível local, considerando cada rio separadamente, ao invés de empregar escalas regionais maiores.

ABSTRACT

Phylogeography is a lack of biogeography that investigates the processes that rules the geographic distribution of genetic lineages. Thus, through phylogeographic studies are possible to investigate population processes and regional models that interferes on diversity and distribution of populations. Phylogeography studies can also generate a basis for conservation studies because species diversity represents the amplitude of evolutionary and ecological adaptations in relation to certain environments. Stingrays are part of Chondrichthyes Class, Elasmobranchii subclass. The species of Elasmobranchii, that are exclusively from freshwater and have a complete lifecycle in continental waters, are placed on Potamotrygonidae family, and occurs only on the neotropical region, México and South America. Potamotrygonidae family is composed by a monophyletic group with three genera: *Paratrygon* Duméril, *Potamotrygon* Garman and *Pleisiotrygon* Rosa, Castello & Thorson. Most part of its species have a restricted distribution to one unique basin or fluvial system. Just *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Paratrygon aiereba* species are found in more than one basin. The present study aims to investigate the genetic structure of *Paratrygon aiereba* in five rivers from Amazon region: Rio Negro, Solimões-Amazonas system, Tapajós, Xingu and Araguaia. For that, the molecular markers used were the fragment of ATPase and D-Loop of mtDNA of *Paratrygon aiereba*. The results showed that the populations of this specie are structured inside each river, with restrict gene flow, or even without gene flow, showing a positive correlation between genetic and geographic distances. It was also observed a high level of genetic diversity in the populations, and the populations at the Araguaia river was the most different form the others, making them a different evolutionary unit. Considering that, conservation

strategies need to be taken in local scales, for each river, instead of using higher regional scales.

1. INTRODUÇÃO

Organismos possuem padrões de distribuição geográfica que variam em seu alcance, frequência de ocorrência e grau de continuidade geográfica (Humphries & Parenti, 1986). Entender esses padrões através dos processos históricos, analisando como a evolução da geomorfologia de uma região influenciou na atual distribuição dos organismos, é o papel da ciência conhecida como biogeografia (Pianka, 1982; Ricklefs, 1993).

Em 1858, o naturalista W.L. Sclater foi o primeiro a sugerir a divisão mundial em regiões biogeográficas a partir de observações da distribuição geográfica de pássaros. Alguns anos mais tarde, Wallace (1876) considerou que essa divisão era válida não somente para pássaros como também para outros táxons. Assim, foram propostas cinco grandes regiões biogeográficas, Paleártica, Neártica, Australiana, Etiópica e Neotropical, sendo que essa abrange toda a América do Sul e central até o México (Figura 1).

A região Neotropical tem sido alvo de muitos estudos biogeográfico dos mais diversos táxons. A complexa história geomorfológica das Américas do Sul e Central, assim como, a topografia acidentada de algumas porções dessa regiões fazem, particularmente, da ictiofauna Neotropical, uma rica fonte potencial para estudos de biogeografia histórica (Vari e Malabarba, 1998).

A dispersão de peixes de água doce está diretamente relacionada às conexões entre as bacias de drenagem e seu histórico de formação, de modo que a análise de seus padrões biogeográficos permite inferir sobre a distribuição de espécies da região em questão ao longo do tempo geológico. Dessa forma, os rios podem ser considerados bons cenários para a criação de modelos de subdivisão de táxons, permitindo a caracterização da dinâmica de dispersão, diferenciação geográfica e formação de novas espécies (Bermingham e Mortiz, 1998; Lundberg *et al*, 1998; Montoya-Burgos, 2003).

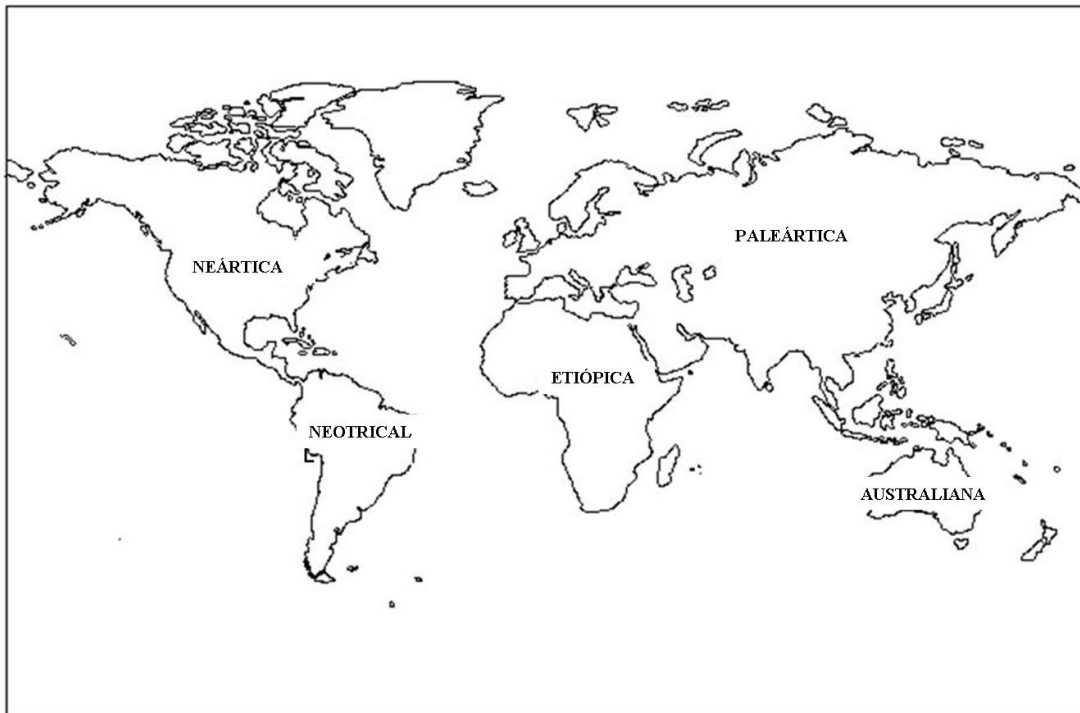


Figura 1: Regiões Biogeográficas propostas por Wallace em 1876.

Quando o estudo desses princípios e processos é por meio de linhagens genéticas, cuja relação filogenética é conhecida ou pode ser estimada pela distribuição espacial dos alelos, é chamado de filogeografia. As análises filogeográficas também permitem obter informações sobre a evolução da paisagem, incluindo a dispersão de táxons, migração de espécies ao longo de uma região, especiação, radiação adaptativa e extinção, além de, indicar possíveis pressões ecológicas evolutivas que resultaram na modelagem da distribuição dos organismos (Avice, 2000). Logo, possibilitam a investigação de processos populacionais e modelos regionais que interferem na diversidade e distribuição das populações (Bermingham e Mortiz, 1998).

Os primeiros estudos a introduzir as idéias da filogeografia da maneira como elas são apresentadas hoje, foram publicados no final da década de 70 por Avice e

colaboradores, e somente em meados da década de 80, começariam realizar-se trabalhos de filogeografia em peixes (Avice, 2000). A partir de então, muitos trabalhos vêm sendo feitos na tentativa de buscar padrões e entender melhor os processos evolutivos relacionados à formação das bacias hidrográficas e à divisão dos táxons na região Neotropical, como por exemplo, estudos com os gêneros *Brachyhyopomus*, *Pimelodela* e *Roeboides* na América Central (Bermingham e Martin 1998), gênero *Potamorraphis* nas bacias do Amazonas e Orinoco (Lovejoy e Araújo, 2000), gênero *Prochilodus* nas bacias do Amazonas, Orinoco e Paraná (Sivansundar *et al.*, 2001), gênero *Leporinus* na bacia do Paraná (Martins *et al.* 2003), gênero *Hypostomus* nas principais bacias da região Neotropical (Montoya-Burgos, 2003), gênero *Brachyplatystoma* no eixo Estuário-Amazonas-Solimões (Formiga, 2004 e Batista, 2006) gênero *Hypopygus* na bacia do rio Negro (Schmitt, 2005) e ordem Characiformes também nas principais bacias hidrográficas da América do Sul (Hubert e Renno, 2006).

Uma parte significativa da diversificação de peixes de água doce e outros organismos aquáticos Neotropicais ocorreram devido à dinâmica de formação dos rios da América do Sul durante o final do período Cretáceo e Cenozóico (Lundberg *et al.*, 1998). Esses mesmos autores sugeriram que esse processo durou aproximadamente 90 milhões de anos, e durante esse período ocorreram três importantes eventos geológicos que contribuíram para a diversificação da ictiofauna neotropical: (1) a abertura do oceano Atlântico e o isolamento da América do Sul; (2) a complexa formação dos Andes; (3) e a formação do istmo do Panamá separando o oceano Atlântico do Pacífico, e conectando as Américas do Sul e do Norte.

O soergimento dos Andes teve um grande impacto em relação à ictiofauna, por ter causado fragmentação da região do alto Amazonas, o que separou alguns grupos monofiléticos de peixes (Albert *et al.*, 2006). Alterou a mudança do curso do rio

Amazonas, na medida que o “paleo” sistema Solimões-Amazonas, que drenava de Leste para Oeste, passou a drenar de Oeste para Leste e desaguar no oceano Atlântico. Como parte deste processo, houve também a formação de arcos estruturais que auxiliaram na modelagem de toda a bacia Amazônica e no estabelecimento de seus tributários (Hoorn *et al.*, 1995; Lundberg *et al.*, 1998; Montoya-Burgos, 2003; Hubert e Renno, 2006).

Além destes processos, durante todo o período de formação da hidrografia da América do Sul ocorreram invasões marinhas no continente. Essas ingressões aparentemente foram mais intensas no período do Mioceno, há aproximadamente 20 a 10 milhões de anos, mesmo período em que ocorreu a formação dos Andes e o fechamento do ístimo do Panamá (Lundberg *et al.*, 1998). Lovejoy e colaboradores (2006) mostraram que essas ingressões marinhas levaram à origem de grupos peixes de água doce derivados de grupo de marinhos, como as anchovas, os peixes-agulha, e as raias de água doce. Os autores também argumentaram que a região do Caribe e/ou oceano Pacífico funcionaram como a porta de entrada desses ancestrais. Assim, os autores sugerem que deve ter ocorrido uma longa conectividade dos sistemas alagados da região alto Amazonas com o oceano, possibilitando a formação habitats com vários níveis de salinidade e barreiras intermitentes, que levou as condições ideais para a evolução da tolerância a água doce e o isolamento dessas linhagens evolutivas (Figura 2).

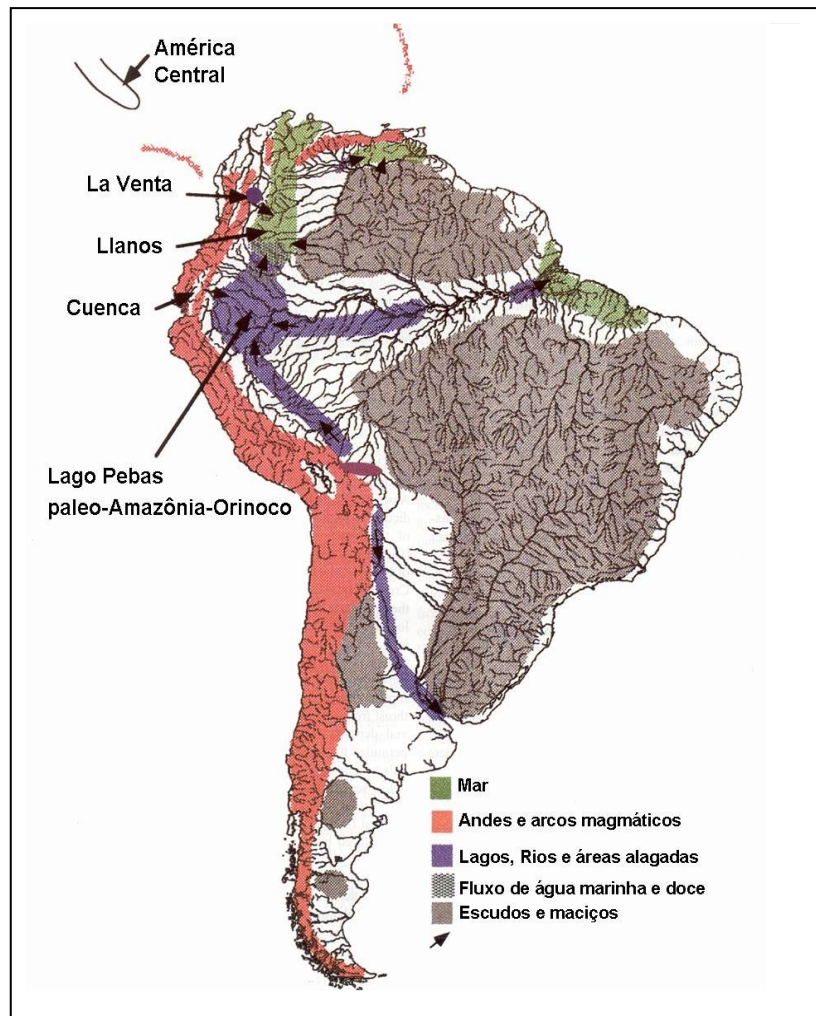


Figura 2: Mapa ilustrando como ocorreram as incursões marinhas no início do período do Mioceno (20 a 11,8 Milhões de anos). Lundberg *et al.*, 1998.

1.1 Raias de água doce

Raias ou arraias, juntamente com os tubarões e quimeras, são peixes cartilaginosos e fazem parte da Classe Chondrichthyes (Subclasse Elasmobranchii) (Nelson, 1994). Estas habitam áreas que abrangem ecossistemas marinhos, eurialinos e de água doce (Brooks e McLennan, 1991). Apesar de sua ampla distribuição mundial, pouco é conhecido sobre a biologia, história natural e ecologia das raias e pouca informação é disponível sobre os modelos de reprodução, demografia e/ou estrutura genética para a maioria dos

elasmobrânquios (Feldheim *et al.*, 2001). As poucas informações disponíveis em geral são restritas às espécies marinhas.

O único grupo de espécies de Elasmobranchii verdadeiramente de água doce, com ciclo de vida completa em águas continentais, pertence à Família Potamotrygonidae, exclusiva da região Neotropical (Araújo *et al.*, 2001). Acredita-se que seu ancestral era marinho (Lovejoy *et al.*, 1998 e Carvalho *et al.*, 2004).

A Família Potamotrygonidae forma um clado monofilético com três gêneros: *Potamotrygon* German (com 16 espécies descritas); *Plesiotrygon* Rosa, Castello & Thorsan, um gênero monoespecífico e; *Paratrygon* Duméril (Carvalho *et al.* 2003), que até 2004 era considerado um gênero monoespecífico, mas agora vem sendo reconhecido por especialistas como um complexo de espécies (Charvet-Almeida *et al.*, 2005).

No Brasil são encontradas 15 espécies de raias pertencentes aos três gêneros, mas esse total ainda não é definitivo, pois novas espécies, incluindo um novo gênero, vêm sendo descritas para os rios Negro e Tapajó e para baía de Marajó, (Araújo, 1998; Charvet-Almeida, 2001, Carvalho *et al.*, 2003).

Poucas espécies, como *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Paratrygon aiereba* estão presentes em mais de uma bacia hidrográfica na região Neotropical (Figura 3). Apesar dessas características, as raias de água doce exploram diversos hábitats, que vão desde praias, florestas inundadas, pequenas enseadas de fundo rochoso ou barrento, folhiço e até lagos (Carvalho *et al.*, 2003).

As raias de água doce possuem compartilhamento de caracteres biológicos com os elasmobrânquios marinhos como, baixa fecundidade, maturação sexual tardia e baixa taxa de crescimento (Araújo *et al.*, 2001). A gestação (variando de 3 a 12 meses, conforme a espécie) pode ser restrita a determinadas estações do ano, a temporada de nascimento dura de 3 a 4 meses ou pode ocorrer ao longo do ano todo (Carvalho *et al.*, 2003).



Figura 3: Mapa hidrográfico da América do Sul, em destaque, os rios Orinoco e Amazonas.

Para *Paratrygon aiereba*, estudos sobre sua biologia reprodutiva na bacia do rio Orinoco constataram que esses animais possuem uma fecundidade baixa (média de dois filhotes por gestação) (Lasso *et al.*, 1996), maturidade sexual atingida a partir dos 15 anos e longevidade estimada em torno dos 70 anos (P. Charvet-Almeida, *comunicação pessoal*). Entre os representantes da Família Potamotrygonidae, a espécie *Paratrygon aiereba*, é a que atinge o maior tamanho (Figura 4) (Lasso *et al.*, 1996). No Brasil, pesquisadores do Projeto de Manejo de Recursos Naturais da Várzea, recentemente capturaram na calha do

rio Solimões um exemplar de 72Kg e aproximadamente 2m de comprimento (P. Charvet-Almeida, *comunicação pessoal*).



Figura 4: Espécie *Paratrygon aiereba*, coletada no Rio Negro. (Foto: M.L. Araújo)

Análises filogenéticas feitas por Lovejoy (1996) com caracteres morfológicos e Lovejoy e colaboradores (1998) utilizando marcador molecular, o citocromo B, indicaram que dentro da Família Potamotrygonidae, o gênero *Paratrygon* é o mais basal, sendo *Potamotrygon* e *Plesiotrygon* gêneros irmãos. Com base em biogeografia histórica, propuseram que as raias de água doce derivaram de espécies marinhas, diferenciadas em função de introgressões que abrangeram o alto Amazonas no começo do Período Mioceno (15-23 milhões de anos atrás) antes do fechamento do Panamá. Com a volta do oceano ao seu nível normal, um grupo ancestral teria ficado preso dentro do continente dando origem a família Potamotrygonidae, e o mesmo ancestral teria dado origem ao grupo *Himantura* Amphi-Americana, de raias marinhas (Dunn *et al.*, 2003). Entretanto, segundo Carvalho *et al.* (2004), comparando caracteres morfológicos de fósseis de raias de água doce dos organismos atuais, mostrou que a origem deste grupo foi há aproximadamente 50 milhões de anos, no período do Eoceno, quase 30 milhões de anos antes do que foi sugerido por

Lovejoy *et al.*, (1998). Segundo Lundberg *et al.*, (1998) também houve incursões marinhas no Eoceno, no entanto, no período do Mioceno elas foram mais intensas e frequentes (Figura 5). Apesar, de alguns conflitos, os autores concordam que a família Potamotrygonidae é um grupo monofilético, corroborando a hipótese de apenas um grupo ancestral invadiu o continente e deu origem a esse grupo.

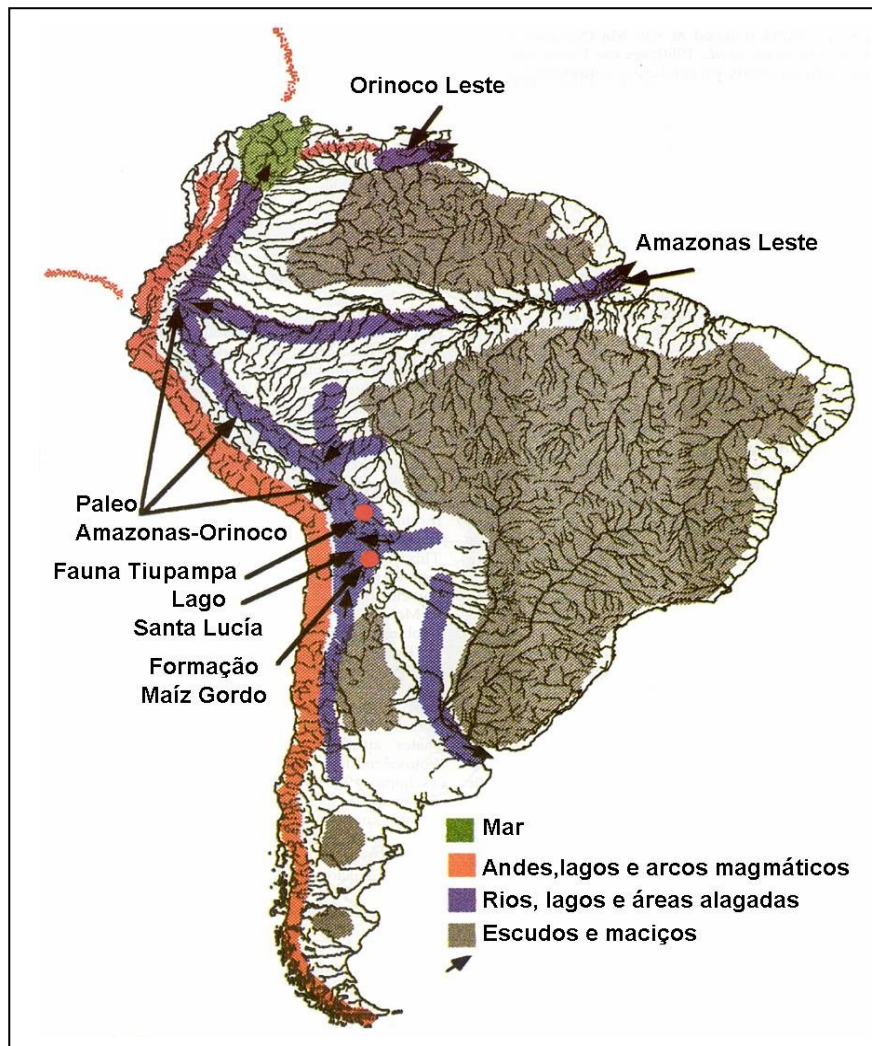


Figura 5: Mapa ilustrando como ocorreram as incursões marinhas no período do Eoceno (Terciário 60 a 43 Milhões de anos). Lundberg *et al.*, 1998.

2. OBJETIVOS

Verificar se há estruturação genética relacionada à geografia entre as populações da espécie *Paratrygon aiereba* na bacia Amazônica.

2.1. Objetivos específicos

- Caracterizar geneticamente essas populações por meio de seqüências de DNA mitocondrial.
- Calcular a divergência genética e outros parâmetros evolutivos entre essas populações
- Verificar se há fluxo gênico entre essas populações, e relacionar com a geografia e eventos geológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

A bacia Amazônica, incluindo o rio Tocantins, possui uma área de drenagem de aproximadamente 7.050.000 km², abrangendo toda a região norte, uma porção do Brasil central, e partes da Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia (Lundberg, 1998; Goulding *et al.*, 2003). O “sistema Solimões-Amazonas”, aqui considerado, está localizado entre os escudos das guianas e brasileiro, sendo que a sua geomorfologia é influenciada e modelada por esses escudos e pelos arcos estruturais. A maioria dos grandes tributários da margem direita do sistema Solimões-Amazonas possui suas cabeceiras no escudo brasileiro como os rios Tocantins-Araquáia, Xingu e Tapajós, ou nos Andes como os rios Madeira Juruá e Purus. Já os rios Negro, Branco e os demais principais tributários da margem esquerda do Solimões-Amazonas como, Uatumã, Trombetas, Paru e Jarí, drenam o escudo das guianas, e os rios Içá, Japurá e Napo possuem suas cabeceiras nos Andes (Lundberg, 1998).

Com o objetivo de amostrar alguns dos principais afluentes baixo do sistema Solimões-Amazonas com diferentes tipos de água, foram analisados exemplares provenientes das seguintes drenagens: Solimões-Amazonas (calha principal área logo a montante de Tefé até a foz do Amazonas na ilha de Marajó), rio Negro (principal afluente da margem esquerda), rios Tapajós, Xingú, (principais afluentes da margem direita) e rio Araguaia (principal afluente do rio Tocantins) (Figura 6).

Abrangeu-se os três tipos de águas em que as raças são encontrados na bacia amazônica: claras, brancas e negras (Sioli, 1985), com diferentes valores de pH, condutividade e turbidez, devido à quantidade de sedimento carregado, que influenciam na distribuição da ictiofauna (Hinch & Collins, 1993, Goulding *et al.*, 1988).

O rio Solimões nasce na região dos Andes e quando encontra o rio Negro, passa a ser chamado de rio Amazonas. Caracteriza-se por possuir águas barrentas devido à grande quantidade de sedimento em suspensão. O sistema Solimões-Amazonas possui proximadamente 6.000km de extensão, sendo metade na Colômbia e Peru e, metade em território brasileiro, correndo de oeste para leste até desaguar no Oceano Atlântico (Barthem, 2001).

Drenando terras baixas originárias do Período Terciário, o rio Negro caracteriza-se por possuir água de cor negra e pH ácido (3,5 a 5,5) devido a grande quantidade ácidos húmicos dissolvido e ao baixo nível de sedimento transportado (Goulding *et al.*, 1988; Ayres, 1995). Sua bacia de drenagem possui aproximadamente 2.500km de extensão, abrangendo no Brasil os estados do Amazonas e Roraima, além de uma ligação pelo canal de Casiquiare, com a bacia do rio Orinoco (Goulding *et al.*, 1988).

Os rios Tapajós, Xingú e Araguaia têm origem no Escudo Central Brasileiro, que possui sedimentos do Período Cretáceo e solo já bastante erodido com pouco sedimento disponível para carreamento (Barthem, 2001). Como o rio Negro, podem ser pobres em sedimento, caracterizando-se como rios de águas claras (Sioli, 1985; Ayres, 1995), mas também podem apresentar alguns trechos mais ricos em matéria orgânica dissolvida, devido a contribuição de suas sub-bacias. O rio Araguaia, também nasce no escudo Brasileiro, é um o principal afluente do rio Tocantins que deságua próximo à foz do rio Amazonas, o que torna suas águas mais turvas em seu trecho inferior (Barthem e Goulding, 1997).

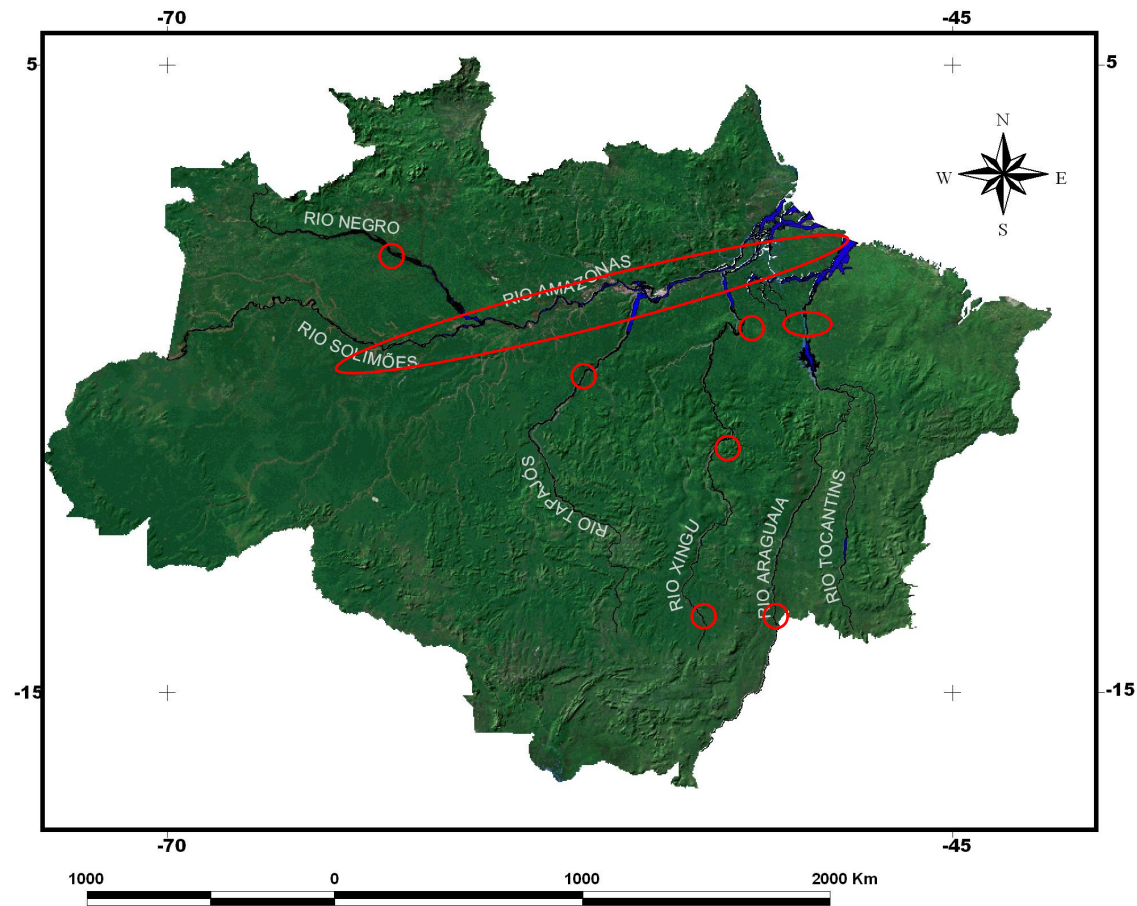


Figura 6: Mapa da Amazônia Legal e em destaque os rios onde foram coletados os espécimens de *P. aiereba* para esse estudo. Círculos vermelhos indicam a região onde os espécimens foram coletados. Fonte: SDS – Batista, R.

3.2. Amostragem

As amostras de tecido utilizadas para análise genética de *Paratrygon aiereba* foram gentilmente fornecidas por três grupos de pesquisa atuantes na região norte do Brasil: dos rios Negro e Tapajós, pela equipe da pesquisadora MSc. Lúcia Araújo (UFAM); dos rios Araguaia, pela equipe da Universidade de São Paulo (USP) coordenada pelo Dr. Fernando Marques; e dos rios Solimões - Amazonas e Xingu, por uma equipe do Museu Paraense Emilio Goeldi / Universidade Federal do Pará (MPEG/UFPA), e Universidade Federal da Paraíba (UFPB) coordenada pela pesquisadora Dra. Patrícia Charvet-Almeida.

Com apoio da equipe da pesquisadora MSc. Lúcia Araújo, uma única campanha para coleta de amostras de *Paratrygon aiereba* foi realizada na região do médio rio Negro, próximo à sede do município de Barcelos-AM. Essa campanha ocorreu no mês de outubro de 2004, período de seca nessa região onde o nível de água do rio estava baixo, o que facilitou a coleta dos exemplares. Para a coleta dos animais foram utilizados espinheis, para capturar os animais na calha do rio, e puçás, para a captura nas praias.

Considerando que o maior período de atividade desses animais ocorrer durante a noite (Araújo, 1998; Charvet-Almeida, 2001), os espinhéis foram dispostos ao entardecer, e foram verificados aproximadamente a cada 2-3h, até o amanhecer do dia seguinte. Para as iscas foram utilizados pedaços de peixes disponíveis no local sem preferência por espécie. Após a captura, os animais foram identificados, fotografados e tiveram suas medidas tomadas de comprimento total (Lt - cm), comprimento padrão (Lp - cm), diâmetro do disco (Dd - cm) e peso total (Pt - g). As amostras de tecido muscular (assim como daquelas doadas) foram retiradas da região ventral do animal e conservadas em etanol 70% ou 100%.

Para fins de análise genética, a priori, cada rio amostrado foi considerado hipoteticamente como sendo uma população e todas as áreas de amostragem foram georreferenciadas.

3.3. Marcador Molecular

Aproximadamente 70% dos estudos de filogeografia utilizam o DNA mitocôndrial (DNAMt) como ferramenta de análise. Na década de 80, houve um aumento exponencial no conhecimento sobre a estrutura e evolução da mitocôndria, e vários estudos mostraram as vantagens na utilização dessa estrutura para a filogeografia (Avise, 2000).

Alguns trabalhos têm destacado as vantagens de se fazer estudos sobre de filogeografia utilizando DNA mitocôndrial (DNAMt), como: alta taxa evolutiva, taxa de mutação de cinco a dez vezes maior que o DNA nuclear, grande número de cópias por célula, ausência de recombinação (devido ao modo de herança materna, pode-se monitorar com maior fidelidade a questão da migração), baixo peso molecular e formato circular (Figura 6), propriedades estas que conferem algumas vantagens em estudos populacionais (v. Brown, 1980, Brown *et al.*, 1981, Avise, 1998 e 2000).

O tamanho do genoma mitocôndrial dos vertebrados pode variar de 6Kb a 2000Kb e sua organização parece ser extremamente conservada em grupos taxonômicos distintos (Sole-Cava, 2001). Em espécies de elasmobrânquios marinhos já foram publicadas algumas seqüências completas de DNAMt, evidenciando que seu tamanho é similar ao de outros vertebrados (Heist, 2004).

Existem indícios de que o DNAMt dos tubarões varia a uma taxa menor que dos mamíferos (Martin *et al.*, 1995; Martin, 1999) e trabalhos utilizando a região *D-Loop* mostraram-se muito eficientes em estudos populacionais deste grupo de organismos (Heist, 2004). Ainda, outros fragmentos do DNAMt como ND2/ND4 e ATPase 6 e 8, também se

3.4.2. Amplificação e seqüenciamento:

Foram amplificados dois fragmentos do DNAm, a região *D-Loop* e a ATPase subunidades 6 e 8.

Região Controle do DNA mitocôndrial (D-Loop)

Devido à falta de estudos genéticos prévios para esse grupo fez-se necessário desenhar um par de *primers* específico para a região *D-Loop* de *Paratrygon aiereba*. Para isso foram utilizados os *primers* universais CB3R e 12SAR (cf. Palumbi, 2001) para a amplificação de uma porção do Citocromo b (Cytb) e do 12S, regiões adjacentes ao *D-Loop* (Figura 7).

Com esses *primers* foi possível amplificar o final do Cytb e o início do *D-loop*, sentido 5' - 3', fita L, e o início do 12S e o final do *D-loop*, fita H. Após a amplificação o fragmento foi seqüenciado a fim de ser desenhado um *primer* interno que abrangesse somente a região *D-loop*. O produto gerado pelo seqüenciamento foi alinhado com fragmentos de espécies de raias marinhas, disponíveis no banco de dados genético na internet, GeneBank, para que o *primer* interno pudesse ser desenhado na região mais conservada possível. Foram desenhados um *primer forward* no final do cytb - início do RNAt treonina (TPA-F), e um reverso no RNAt fenilalanina (PHE), Figura 8, este último desenvolvido pelo Dr. Fernando Marques da Universidade de São Paulo (USP). A Tabela 1 apresenta as seqüências dos *primers* utilizadas nesse trabalho.

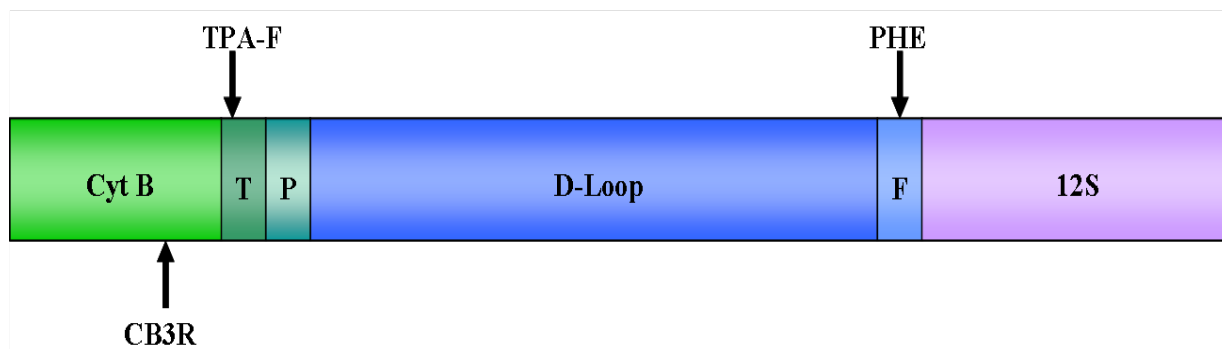


Figura 8: Esquema da localização dos *primers* em *P. aiereba*. CB3R- *primer* universal localizado no citocromo B, PHE – *primer* desenhado por F. Marques, localizado no final da fenilalanina e final do *D-loop* e TPA-F – *primer* desenhado neste estudo, adjacente ao início da região *D-loop*.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação da região *D-Loop* e ATPase de *Paratrygon aiereba*.

Fragmento	Primer	Sequências	Referência
Citocromo b	CB3R	5' – CATATTAAACCCGAATGATATTT – 3'	Palumbi, 2001
12S	12SAR	5'- ACCTGGGGATTAGACCCCACTAT – 3'	Palumbi, 2001
<i>D-Loop</i>	TPA-F	5' - CGGTCTTGTAACCGAAG - 3'	Este estudo
<i>D-Loop</i>	PHE	5' – GCACTGAAGATGCTAAGATA – 3'	Marques, <i>com. pess.</i>
ATPase	PotaATPf2_Lys	5'– GGGTCYAGCATTAGCCTTT – 3'	Toffoli, 2006
ATPase	PotaATPr2	5'– GTTAGTGGTCAGGGGCTTGG – 3'	Toffoli, 2006
ATPase	PotaATP_F3	Não publicado	Toffoli, <i>com. pess.</i>
ATPase	PotaATP-r	Não publicado	Toffoli, <i>com. pess.</i>

A amplificação do DNA foi feita através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR), no qual foram utilizados os *primers* desenhados e temperaturas específicas (Anexo 2). Em seguida, o produto do PCR foi

verificado por uma eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, conforme já mencionado, utilizando o marcador Ladder 1Kb plus (Invitrogen®) e purificado por reação enzimática com as enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase (ExoSAP-I) (Anexo 3).

A reação de seqüenciamento foi feita em placas de 96 “wells” (poços), com os mesmos *primers* utilizados na reação de PCR seguido da precipitação da reação na própria placa, para eliminar o produto não incorporado durante a reação de seqüenciamento (Anexos 4 e 5, respectivamente). A reação foi levada ao seqüenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (GE® – *Health Care*) nas condições de injeção e corrida recomendadas pelo fabricante.

Para confirmar se o fragmento seqüenciado correspondia ao *D-loop*, as seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* - Blast (Zhang *et al*, 2000).

ATPase

Para amplificação da ATPase foram utilizados *primers* desenhados para o gênero *Potamotrygon* (Tabela 1) desenvolvidos por Toffoli (2006) do Laboratório de Genética Animal (LEGAL) da UFAM.

A amplificação foi feita com *primers* PotaATPf2_Lys (*Forward*) e PotaATPr2 (reverso) (Toffoli, 2006), localizados na região inicial e final da ATPase, subunidades 6 e 8. As condições de amplificação desse fragmento estão descritos no anexo 2. A verificação do produto de PCR, assim como a purificação, a precipitação e o seqüenciamento foram realizados conforme já mencionados para *P. aiereba*. No entanto, para a reação de seqüenciamento foram utilizados *primers* internos, PotaATP_F3

(*forward*) e PotaATP-r (reverso), a fim de obter seqüências melhores, também desenvolvidos por D. Toffoli (2006), como mostra a figura 9.

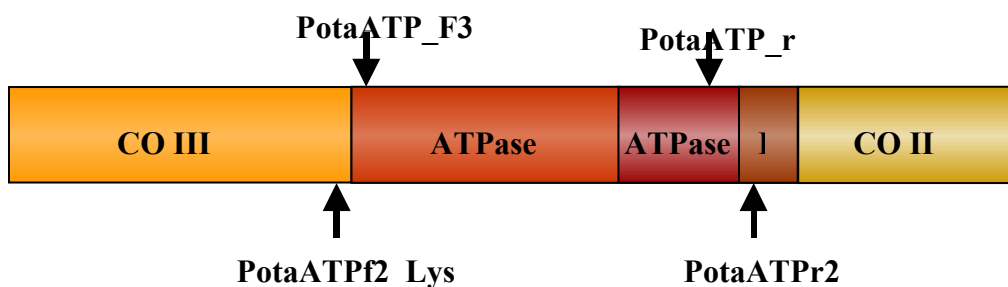


Figura 9: Esquema da localização dos *primers* em *P. aiereba*. PotaATP_f2_Lys e PotaATPr2 – *primers* usados para amplificação, PotaATP_F3 e ATP_r – *primers* usados para o seqüenciamento.

3.5. Análises das seqüências

As seqüências foram conferidas com os eletroferogramas, editadas e alinhadas manualmente com o uso dos programas BioEdit 7.0 e Chromas 2.31, sendo que nos sítios que não puderam ser determinadas as bases nitrogenadas foram adicionados “N”, ou seja, qualquer uma das bases nitrogenadas pode ser considerada pelos programas de análises subsequentes. A determinação dos haplótipos e a obtenção das respectivas árvores foram feitas pelo programa TCS 1.18 (Clemente *et al.*, 2000).

Para as análises filogenéticas a fim de estimar as relações evolutivas entre os indivíduos e as populações, foram feitas análises de Máxima Parcimônia - MP (Hennig, 1966), cujo princípio metodológico consiste em buscar a árvore filogenética com menor número passos evolutivo, a mais parcimoniosa. Esta análise foi feita por busca heurística

com adição aleatória dos terminais (*Random Stepwise Adition*), com 1000 réplicas e rearranjo dos ramos pelo método TBR (*Tree Bisection Reconnection*).

A procura pela árvore mais parcimoniosa foi feita a partir de matrizes com e sem ponderação diferenciada entre transições (TS - mutações entre purinas-purinas e pirimidinas-pirimidinas) e transversões (TV - mutações entre purinas-pirimidinas). Primeiramente, as transições e transverções foram ponderadas iguais (TS=1 e TV=1) e, depois, diferenciadas (TS=1, TV=3) com caracteres não ordenados. A determinação da melhor árvore foi feita através de consenso estrito e da regra da maioria ($\geq 50\%$ de ocorrência) enquanto a robustez dos nós encontrados foi estabelecido pelo método de Bootstrap, re-amostragem com 1000 réplicas.

Utilizando o programa MODELTEST 3.6 (Posada & Crandal, 1998), foi determinado o modelo evolutivo que melhor representa a heterogeneidade nas taxas de substituição nucleotídica. Os parâmetros deste modelo evolutivo foram aplicados na análise de Máxima Verossimilhança – MV (Felsenstein, 1981), que busca uma árvore que apresente a melhor probabilidade de explicar os dados observados. Assim como na MP, a procura da árvore de MV foi feita por busca heurística, adição aleatória dos ramos e rearranjo pelo método TBR, com 1000 réplicas. Além dessas análises, foram determinadas a distância genética não corrigida (p) e a distância genética corrigida a partir do modelo evolutivo dado pelo programa MODELTEST 3.6. Todas essas análises foram feitas utilizando programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 1999).

Para as análises de polimorfismos das seqüências de DNA foi utilizado do programa DnaSP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003), onde foram obtidos os seguintes parâmetros: diversidade nucleotídica (média do número de diferenças nucleotídicas por sítios entre duas seqüências), diversidade haplotípica, número de sítios polimórficos (número de sítios

que apresentam mais de um alelo por *locus*) mutações compartilhadas entre as populações e, estimativa indireta de fluxo gênico entre as populações.

Os parâmetros de estruturação e variabilidade genética intra-populacionais (dentro dos rios) e inter-populacionais (entre os rios) foram determinados pela Análise de Variância Molecular - AMOVA (Ecoffier *et al.*, 1992), pelo programa ARLEQUIN 3.0. O mesmo programa foi utilizado para testar a significância da correlação entre a matriz de distância genética e distância geográfica das populações de *Paratrygon aiereba*, com o uso do teste de Mantel.

4. RESULTADOS

4.1. *D-Loop*

A amplificação com os *primers* desenhados para a região *D-Loop* de *Paratrygon aiereba* resultou em um fragmento de aproximadamente 1800 pares de base (pb). Entretanto, foi possível obter apenas 1400 pb correspondentes, 700 pb do início do fragmento (fita L), e 700 pb do final do fragmento (fita H), faltando a porção mediana com aproximadamente 400 pb (Figura 10). Assim, para que todo o fragmento pudesse ser seqüenciado seria necessário desenhar mais um par de *primers* interno. No entanto, quando feito o *blast* das seqüências geradas, isto é, quando comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados genético disponível na internet (GeneBank), não foi possível determinar se a seqüência era da região *D-Loop* de *Paratrygon aiereba*. O resultado foi o alinhamento de pequenos fragmentos, aproximadamente 100pb, com os mais variados fragmentos de DNA (mitocôndrial e nuclear), dos mais variados grupo de organismos como mamíferos, teleósteos e elasmobrânquios. Assim, não houve uma similaridade consistente que possibilitasse afirmar que o fragmento gerado correspondia a porção *D-Loop* de elasmobrânquios. O tempo disponível para o término deste estudo não permitiu a eliminar completamente a possibilidade de contaminação das amostras, mas várias etapas subseqüentes de trabalho no laboratório apontam para um fenômeno real no *D-Loop* de *Paratrygon*. Estudos adicionais serão necessários para esclarecer esse problema.

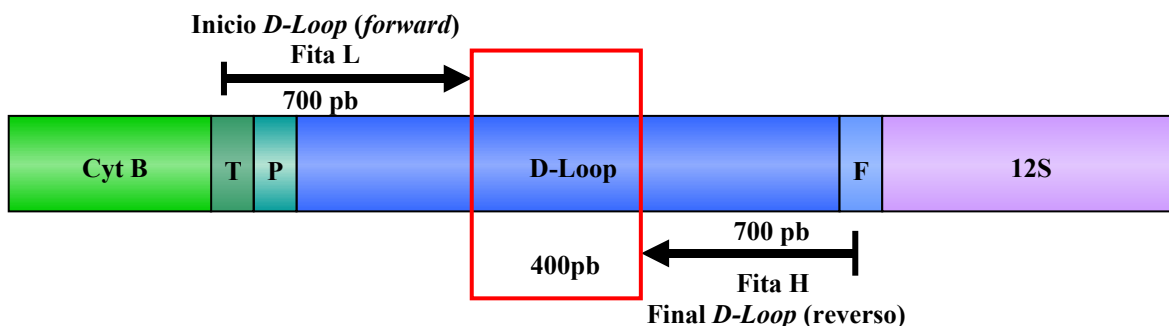


Figura 10: Esquema da porção *D-Loop*. Onde fita L, representa o início do fragmento com 700pb seqüenciados, H é o final da fita também com 700pb seqüenciados, e a porção em vermelho faltou ser seqüenciada.

Em vista disso, esse trabalho sofreu uma mudança metodológica, passando a utilizar como marcador molecular os genes das subunidades 6 e 8 de ATPase, pois outros grupos de pesquisa já estavam trabalhando com este marcador e obtendo sucesso (D. Tofoli, *com. pess*). Mesmo assim, foram feitas algumas análises com as seqüências de *D-Loop*, que serão apresentadas a seguir. Foram obtidas seqüências para apenas três localidades de coleta. Essas seqüências foram analisadas separadamente como fita L, início do fragmento de *D-Loop*, e fita H, final do fragmento de *D-Loop*, pois como ainda não foi desenhado um par de *primers* internos, não foi possível obter a sobreposição dessas seqüências e obter todas as seqüências para os mesmos indivíduos.

Foram obtidas 30 seqüências correspondentes a 30 indivíduos, sendo 21 *forward* (L) e 9 reversas (H), para os rios Negro, Araguaia e Xingu, distribuídas em 20 haplótipos L e 9 haplótipos H, onde nenhum deles foram compartilhados entre essas localidades (Tabelas 2).

Tabela 2. Número de seqüências por haplótipos encontrados para a região *D-Loop forward* (L) e reversa (H) separadamente de *P. aiereba*.

Posição da Fita	Indivíduos	Haplótipos	Localidade		
			Rio Negro	Araguaia	Xingu
<i>Forward</i>	RN001L	Rio Negro 1	1	-	-
	RN002L	Rio Negro 2	1	-	-
	RN005L	Rio Negro 3	1	-	-
	RN008L	Rio Negro 4	1	-	-
	RN011L	Rio Negro 5	1	-	-
	RN015L	Rio Negro 6	1	-	-
	RN016L	Rio Negro 7	1	-	-
	RN017L	Rio Negro 8	1	-	-
	RN020L	Rio Negro 9	1	-	-
	RN022L	Rio Negro 10	1	-	-
	RN026L	Rio Negro 11	1	-	-
	RN028L	Rio Negro12	1	-	-
	RN056L	Rio Negro13	1	-	-
	RN078L	Rio Negro 14	1	-	-
ARA07L	Araguaia 1	-	1	-	
ARA09L	Araguaia 2	-	1	-	
ARA10L	Araguaia 3	-	1	-	

Continuação Tabela 2

Posição da Fita	Indivíduo	Haplótipos	Localidade		
			Rio Negro	Araguaia	Xingu
<i>Forward</i>	ARA11L	Araguaia 4	-	1	-
	ARA13L	Araguaia 5	-	2	-
	ARA14L				
	X000BL	Xingu 1	-	-	1
<i>Reverso</i>	RN008H	Rio Negro 4	1	-	-
	RN013H	Rio Negro 15	1	-	-
	RN015H	Rio Negro 16	1	-	-
	RN022H	Rio Negro 10	1	-	-
	ARA09H	Araguaia 2	-	1	-
	ARA10H	Araguaia 3	-	1	-
	ARA13H	Araguaia 5A	-	1	-
	ARA14H	Araguaia 5B	-	1	-
	X000AH	Xingú 2	-	-	1

Na figura 11 estão representadas as árvores de haplótipos para as duas fitas (L e H) do rio Negro, rio Araguaia e rio Xingu. As divergências genéticas “p”, não corrigida, dentro das populações dos rios Negro e Araguaia e entre as populações, estão representadas na tabela 3.

Para a análise de máxima parcimônia (MP) foram obtidas 80 árvores com IC = 0,794 para a fita L, e uma árvore com IC = 0,911 para fita H. A fim de obter apenas uma árvore, para a fita L, foram usadas as medidas de consenso estrito e da regra da maioria ($\geq 50\%$), na qual, essa última se mostrou melhor resolvida (Figuras 12).

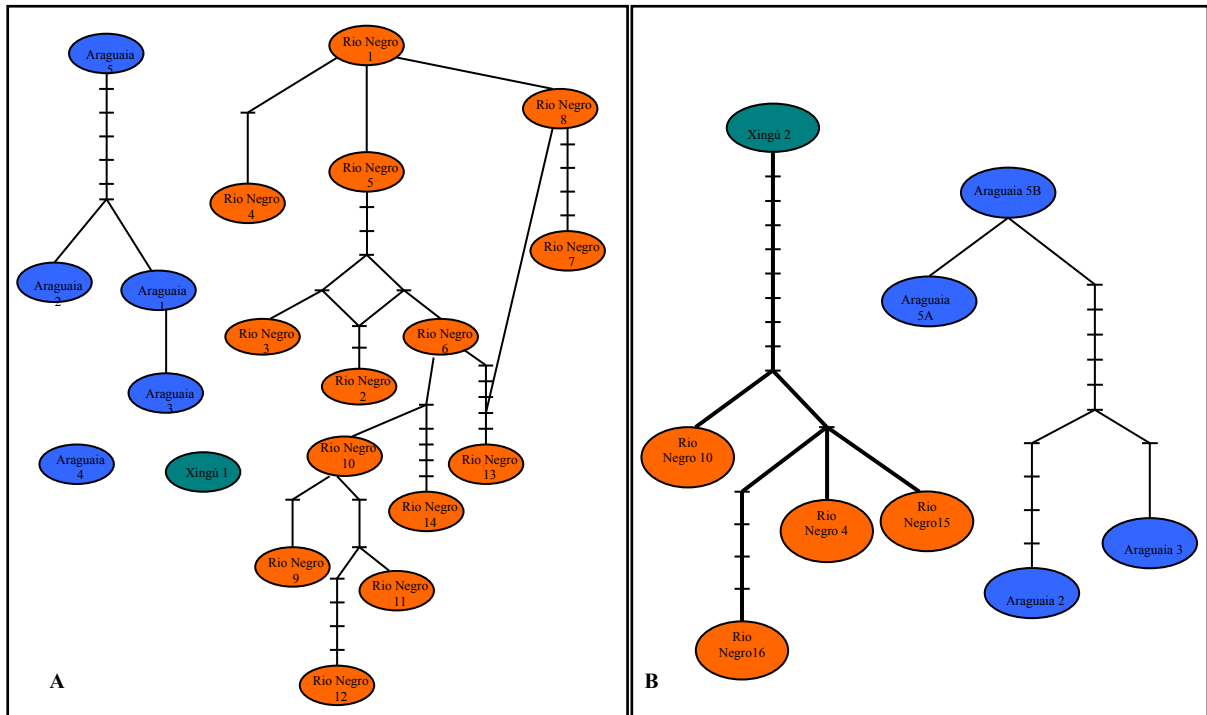


Figura 11: Árvore de haplótipos do fragmento de *D-Loop* de *P. aiereba*, fita L e H, nos rios Negro, Araguaia e Xingu. A – fita L, início do fragmento. B – fita H, final do fragmento. Onde “-” = *missing data*. Rio Negro = Laranja, rio Xingu = Verde e rio Araguaia = Azul.

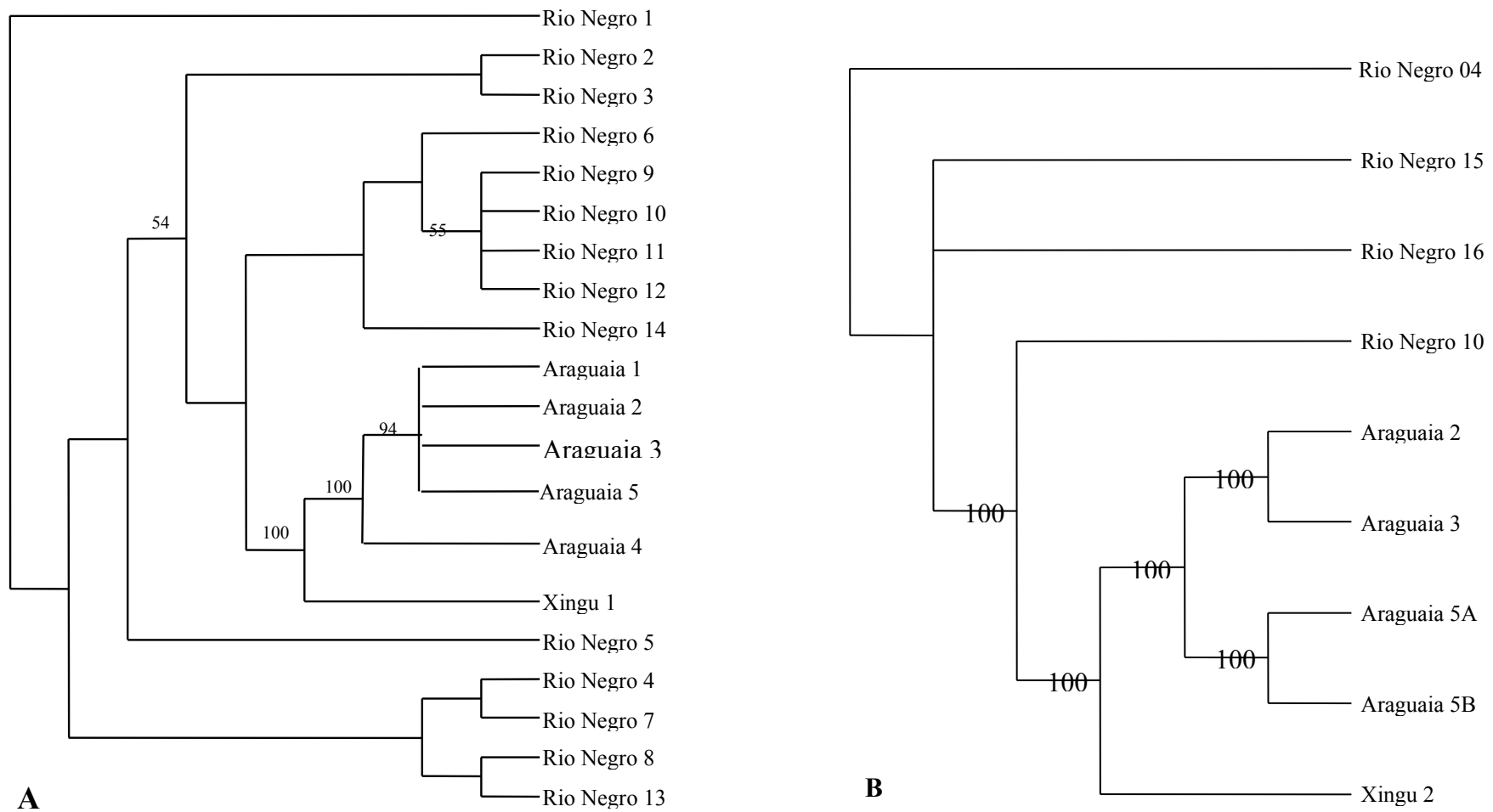


Figura 12: Árvore de máxima parcimônia (*D-Loop*) fitas L e H de *P. aiereba*. A – fita L. B – fita H. Número dos ramos correspondem aos valores de bootstrap.

Tabela 3: Valores percentuais (média \pm desvio padrão) da divergência genética “p”, dentro e entre populações de *P. aiereba* dos rios Araguaia e Negro.

Localidade	Rio Negro L	Rio Araguaia L	Rio Negro H	Rio Araguaia H
Rio Negro L	0,79 \pm 0,38	-	-	-
Araguaia L	7,43 \pm 0,29	1,19 \pm 0,84	-	-
Rio Negro H	-	-	0,33 \pm 0,14	-
Araguaia H	-	-	1,19 \pm 0,15	0,43 \pm 0,22

Para estes segmentos também foram feitas outras estimativas de variabilidade e diferenciação genética, como: número de sítios polimórficos, diversidade genética e diversidade nucleotídica, sendo que para essas análises, não foram utilizadas as seqüências do rio Xingu, pois havia somente uma seqüência para cada fita (Tabela 4).

Tabela 4: Variabilidade genética do *D-Loop* L e H, por localidade de coleta. N - número de seqüências, H - número de haplótipos, S - número de sítios polimórficos, Hd – diversidade genética, SD – desvio padrão e π – diversidade nucleotídica.

Local	N	H	S	Hd \pm SD	π
Rio Negro L	14	14	14	1,000 \pm 0,027	0,0074
Araguaia L	6	5	19	0,867 \pm 0,129	0,0121
Rio Negro H	4	4	5	1,000 \pm 0,177	0,0041
Araguaia H	4	4	6	0,833 \pm 0,222	0,0055

4.2. ATPase

Os *primers* que foram desenhados para ATPase subunidades 6 e 8 amplificaram um fragmento de aproximadamente 800pb. Desta vez, quando as seqüências geradas foram comparadas com as seqüências existentes no GeneBank, pôde-se confirmar que elas realmente correspondiam ao fragmento de ATPase de elasmobrânquios. Assim, foram obtidas um total de 63 seqüências completas de ATPase, subunidades 6 e 8, correspondentes a: 16 do rio Negro, 12 do sistema Solimões/Amazonas (Calha), duas do rio Tapajós, 19 do rio Xingú, 13 do rio Araguaia e 1 do rio Tocantins. Essas apresentaram 31 haplótipos diferentes, com apenas um compartilhamento entre os rios Xingu e Araguaia (Tabela 5).

Tabela 5: Número de seqüências por haplótipos para o fragmento de ATPase subunidades 6 e 8 em indivíduos de *P. aiereba*.

Indivíduos	Haplótipos	Localidades					
		Calha	Rio Negro	Tapajós	Xingu	Araguaia	Tocantins
PRV01	Calha 1	1	-	-	-	-	-
PRV02	Calha 2	5	-	-	-	-	-
PRV04							
PRV05							
PRV08							
AR003							
PRV03	Calha 3	1	-	-	-	-	-
PRV06	Calha 4	1	-	-	-	-	-
PRV07	Calha 5	1	-	-	-	-	-
AR002	Calha 6	1	-	-	-	-	-
TJ01	Calha 7	2	-	-	-	-	-
TJ02							
RN01	Rio Negro 1	-	5	-	-	-	-
RN11							
RN17							
RN27							
RN62							
RN02	Rio Negro 2	-	1	-	-	-	-
RN05	Rio Negro 3	-	1	-	-	-	-
RN16	Rio Negro 4	-	1	-	-	-	-
RN20	Rio Negro 5	-	3	-	-	-	-
RN28							
RN35							
RN24	Rio Negro 6	-	1	-	-	-	-
RN26	Rio Negro 7	-	1	-	-	-	-
RN54	Rio Negro 8	-	1	-	-	-	-
RN77	Rio Negro 9	-	1	-	-	-	-

Continuação Tabela 5

Indivíduos	Haplótipos	Localidade					
		Calha	Rio Negro	Tapajós	Xingu	Araguaia	Tocantins
RN78	Rio Negro 10	-	1	-	-	-	-
TJ03	Tapajós 1	-	-	1	-	-	-
TJ04	Tapajós 2	-	-	1	-	-	-
X001	Xingu 1	-	-	-	3	-	-
X020							
X027							
X003	Xingu 2	-	-	-	12	1	-
X006							
X007							
X008							
X010							
X011							
X012							
X013							
X014							
X015							
X016							
X022							
ARA23							
X004	Xingu 3	-	-	-	2	-	-
X005							
X018	Xingu 4	-	-	-	1	-	-
X025	Xingu 5	-	-	-	1	-	-
ARA01	Araguaia 1	-	-	-	-	1	-
ARA02	Araguaia 2	-	-	-	-	7	-
ARA03							
ARA06							
ARA07							
ARA07							
ARA08							
ARA09							
ARA18							
ARA04	Araguaia 3	-	-	-	-	1	-
ARA05	Araguaia 4	-	-	-	-	1	-
ARA14	Araguaia 5	-	-	-	-	1	-
ARA16	Araguaia 6	-	-	-	-	1	-
TO19	Tocantins 1	-	-	-	-	-	1

O programa TCS 1.18 gerou uma topologia com 6 árvores de haplótipos para o fragmento de ATPase, sendo que o haplótipo “Araguaia 04” esta completamente separado das demais árvores. Os haplótipos Tocantins 1 e Calha 6 apresentam-se em uma árvore pois estes estão geograficamente próximos, Tocantins 1, esta próximo a foz do rio Tocantins, e Calha 6 esta na foz do rio Amazonas. (Figura 13).

Dentre os 56 modelos evolutivos testados, o que melhor se adequou às seqüências foi o modelo evolutivo substituição nucleotídica de HKY+G utilizado para a obtenção das árvores de distância genética corrigida e de máxima verossimilhança (MV). Para a análise de MV foi obtida a topologia, pela regra da maioria (Figura 14). Para a análise de MV foram utilizados os parâmetros α (G) = 0,35, taxa de transição/transversão = 0,3006 e frequência nucleotídica A = 0,30900, C = 0,34030, G = 0,09930 e T = 0,25140, dado pelo modelo evolutivo citado acima.

Para a análise de máxima parcimônia (MP) com ponderação igual entre transição e transversão (TS1/TV1) foi obtido um total de 225 árvores com $IC = 0,787$. Já a análise de MP com ponderação diferenciada entre transição e transversão (TS1/TV3) resultou em 225 árvores com $IC = 0,851$. Para a visualização o de apenas uma árvore foram feitos os consensos estrito e regra de maioria ($\geq 50\%$) de frequência dos ramos, em ambas as análises. Os resultados dessas topologias foram iguais (TS1/TV1 = TS1/TV3) para o consenso de regra de maioria, sendo árvore que melhor representa os dados (Figura 15).

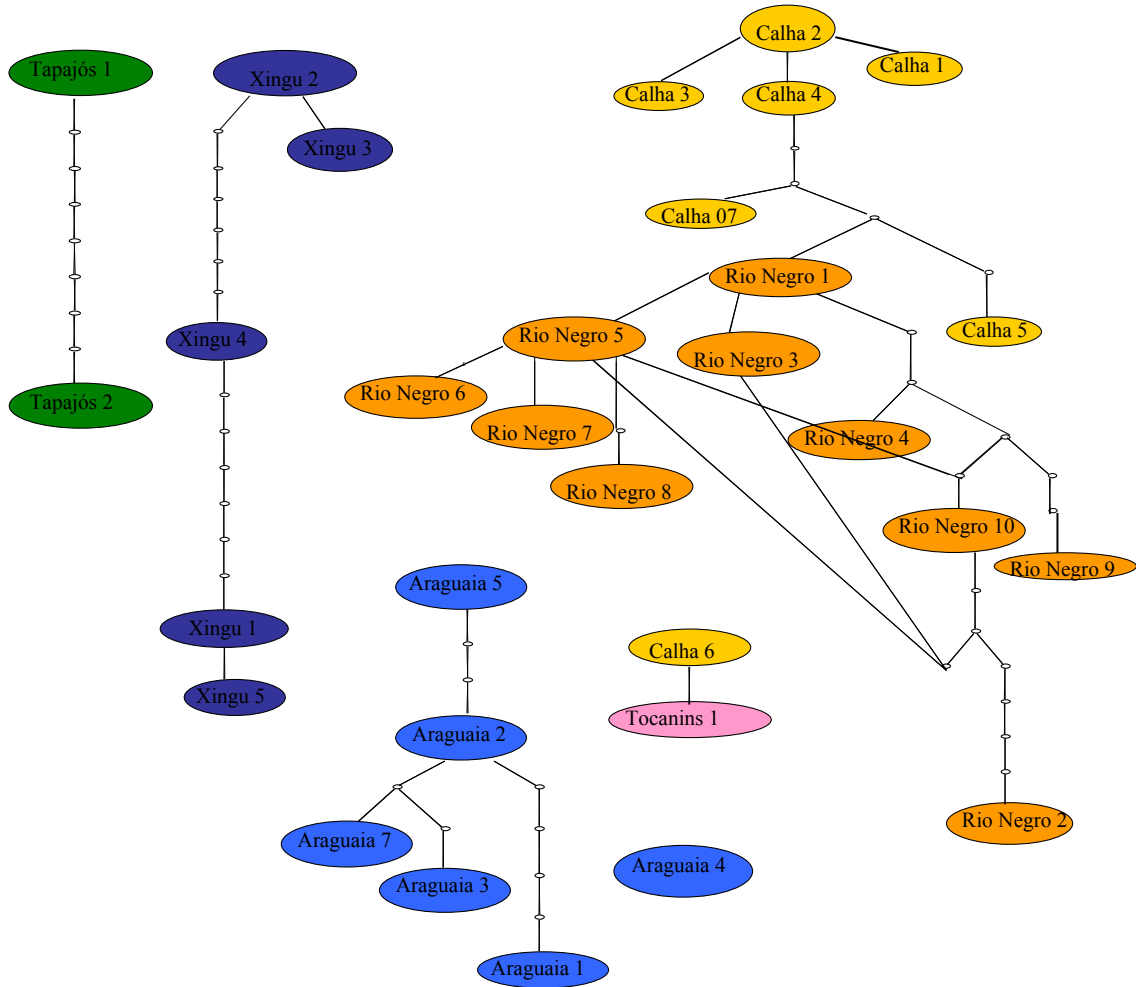


Figura 13: Árvores de haplótipos de *P. aiereba* geradas para o fragmento de ATPase, onde cada cor corresponde ao rio indicado pelo haplótipo. Calha = Amarelo, Rio Negro = Laranja, rio Tapajós = Verde, rio Xingu = Azul escuro, Araguaia = Azul claro, Tocantins = Rosa .

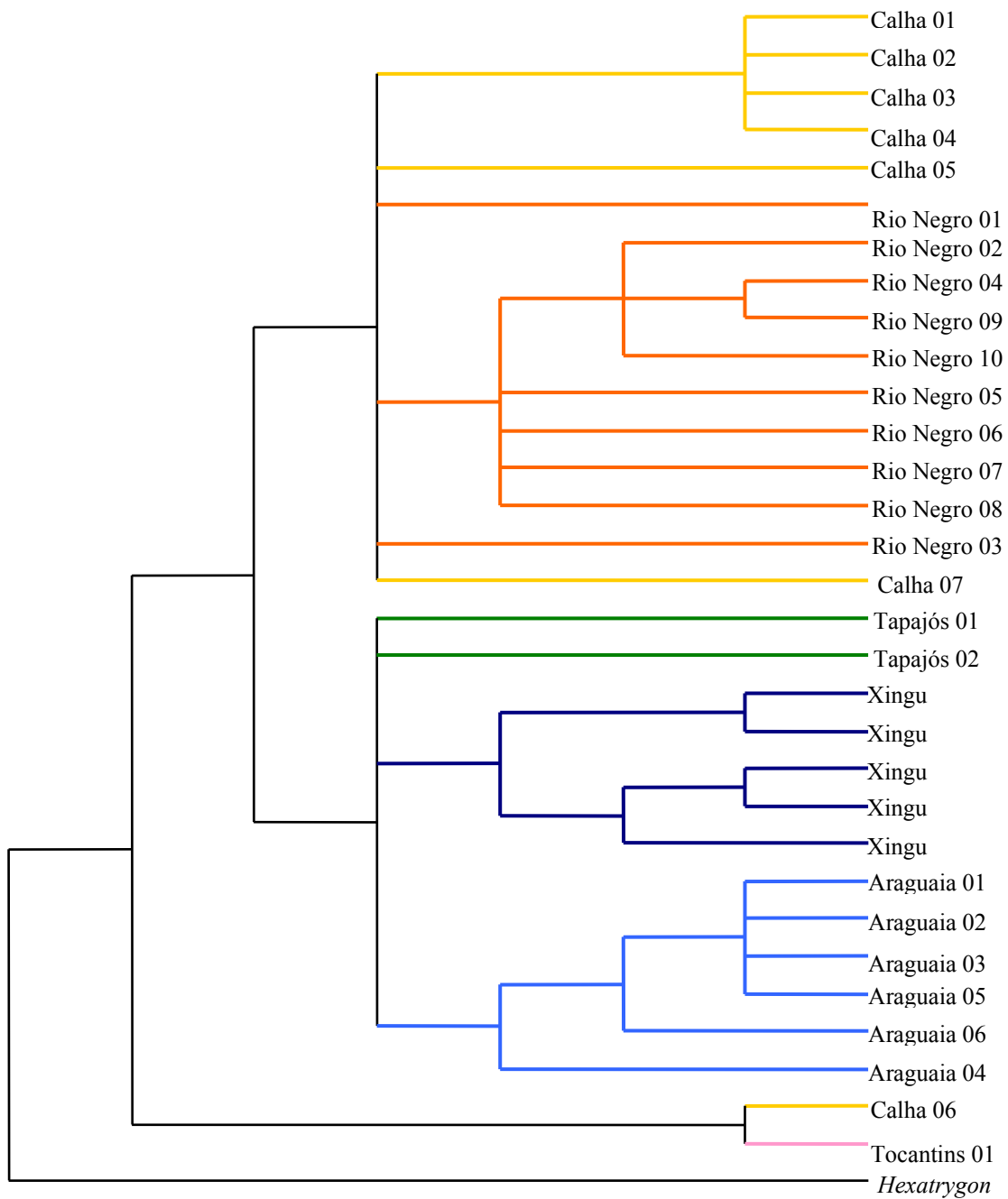


Figura 14: Árvore de máxima verossimilhança gerada a partir do modelo evolutivo de HKY+G para o fragmento de ATPase de *P. aiereba*.

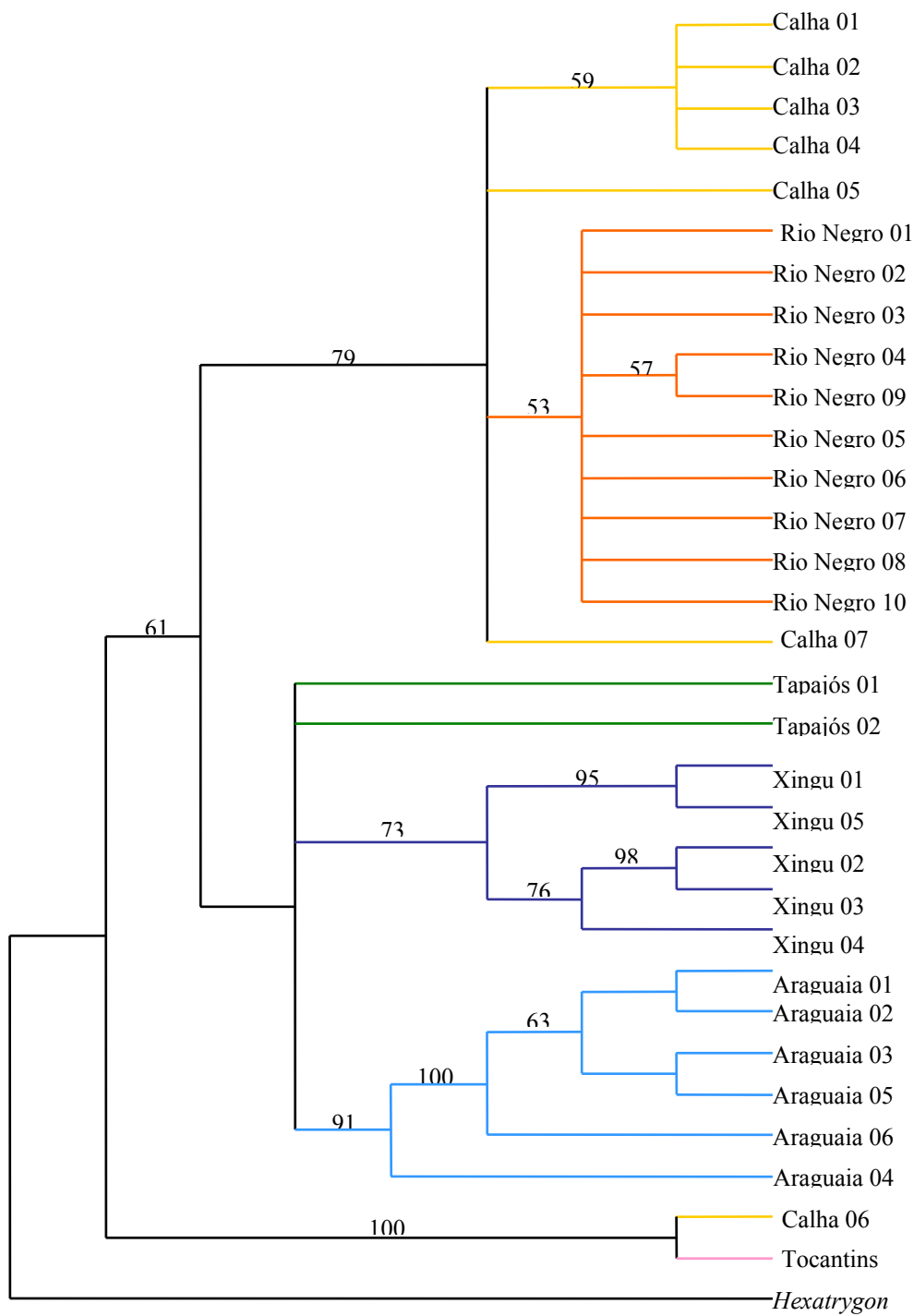


Figura 15: Árvore de máxima parcimônia gerada para o fragmento de ATPase em *Paratrygon aiereba*, números acima dos ramos são os valores de bootstrap.

Com os resultados das filogenias (MP e MV) foi possível observar o mesmo padrão para os diferentes métodos, com princípios diferentes. As árvores geradas foram muito semelhantes entre si, mostrando o mesmo padrão de agrupamento entre as populações. Esses resultados corroboram esse padrão indicando a existência de dois grandes grupos (1) um grupo formado pelos haplótipos encontrados na Calha e no Rio Negro, (2) e outro grupo formado pelos tributários do baixo do médio-baixo Amazonas, incluindo os rios Tapajós, Xingu e Tocantins (Figuras 14 e 15). Entretanto, mesmo havendo uma ligação na árvore de haplótipos as populações do Rio Negro e da Calha, essas parecem ser populações separadas, e as populações dos rios Xingu e Araguaia apresentaram-se separadas nas árvores de haplótipos e monofiléticas nas árvores filogenéticas.

A distância “p” (não corrigida) par a par, entre os haplótipos (Tabela 6) mostra que a maior divergência genética é entre os haplótipos Araguaia 1 e Xingu 3, quando comparados aos demais. Na Tabela 7 está representada a média e o desvio padrão da distância “p” dentro e entre as populações. As divergências encontradas dentro das populações foram baixas, entre 1 e 3%, sendo que os valores encontrados para a população do rio Araguaia, entre 4,5 a 6%, quando comparada com as outras populações, pode ser um indicativo que essa população é uma unidade evolutiva diferenciada.

Tabela 6: Divergência genética entre os haplótipos encontrados para cada localidade amostrada para *P. aiereba*.

Haplótipos	Calha 1	Calha 2	Calha 3	Calha 4	Calha 5	Calha 6	Calha 7	Rio Negro 1	Rio Negro 2	Rio Negro 3	Rio Negro 4	Rio Negro 5	Rio Negro 6	Rio Negro 7	Rio Negro 8	Rio Negro 9	Rio Negro 10
Calha 1																	
Calha 2	0,0017																
Calha 3	0,0034	0,0017															
Calha 4	0,0034	0,0017	0,0034														
Calha 5	0,0086	0,0068	0,0085	0,0085													
Calha 6	0,0259	0,0257	0,0274	0,0240	0,0291												
Calha 7	0,0086	0,0068	0,0085	0,0051	0,0068	0,0257											
Rio Negro 1	0,0069	0,0051	0,0068	0,0068	0,0051	0,0240	0,0051										
Rio Negro 2	0,0208	0,0188	0,020	0,0205	0,0188	0,0377	0,0188	0,0136									
Rio Negro 3	0,0086	0,0068	0,0085	0,0085	0,0068	0,0257	0,0068	0,0017	0,0119								
Rio Negro 4	0,0121	0,0102	0,0119	0,0119	0,0102	0,0291	0,0102	0,0051	0,0154	0,0068							
Rio Negro 5	0,0086	0,0068	0,0085	0,0085	0,0068	0,0257	0,0068	0,0017	0,0119	0,0034	0,0068						
Rio Negro 6	0,0104	0,0085	0,0102	0,0102	0,0085	0,0274	0,0085	0,0034	0,0136	0,0051	0,0085	0,0017					
Rio Negro 7	0,0103	0,0085	0,0102	0,0102	0,0085	0,0274	0,0085	0,0034	0,0136	0,0051	0,0085	0,0017	0,0034				
Rio Negro 8	0,0121	0,0102	0,0119	0,0119	0,0102	0,0291	0,0102	0,0051	0,0154	0,0068	0,0102	0,0034	0,0051	0,0051			
Rio Negro 9	0,0173	0,0154	0,0171	0,0171	0,0154	0,0343	0,0154	0,0102	0,0171	0,0119	0,0085	0,0085	0,0102	0,0102	0,0119		
Rio Negro 10	0,0121	0,0102	0,0119	0,0119	0,0102	0,0291	0,0102	0,0051	0,0119	0,0068	0,0068	0,0034	0,0051	0,0051	0,0068	0,0085	

Haplótipos	Calha 1	Calha 2	Calha 3	Calha 4	Calha 5	Calha 6	Calha 7	Rio Negro 1	Rio Negro 2	Rio Negro 3	Rio Negro 4	Rio Negro 5	Rio Negro 6	Rio Negro 7	Rio Negro 8	Rio Negro 9	Rio Negro 10
Tapajós 1	0,0259	0,0239	0,0256	0,0256	0,0222	0,0326	0,0239	0,0222	0,0359	0,0239	0,0273	0,0239	0,0256	0,0256	0,0273	0,0325	0,0273
Tapajós 2	0,0224	0,0205	0,0222	0,0222	0,0205	0,0291	0,0205	0,0188	0,0325	0,0205	0,0239	0,0205	0,0222	0,0222	0,0239	0,0291	0,0239
Xingu 1	0,0330	0,0309	0,0326	0,0326	0,0309	0,0258	0,0309	0,0292	0,0429	0,0309	0,0343	0,0309	0,0326	0,0326	0,0343	0,0395	0,0343
Xingu 2	0,0260	0,0240	0,0257	0,0257	0,0309	0,0327	0,0309	0,0292	0,0430	0,0309	0,0344	0,0309	0,0326	0,0326	0,0344	0,0395	0,0344
Xingu 3	0,0242	0,0222	0,0239	0,0239	0,0291	0,0343	0,0291	0,0273	0,0410	0,0291	0,0325	0,0291	0,0308	0,0308	0,0325	0,0376	0,0325
Xingu 4	0,0314	0,0293	0,0310	0,0310	0,0328	0,0311	0,0328	0,0310	0,0448	0,0328	0,0362	0,0328	0,0345	0,0345	0,0362	0,0414	0,0362
Xingu 5	0,0347	0,0326	0,0343	0,0343	0,0326	0,0275	0,0309	0,0309	0,0446	0,0326	0,0360	0,0326	0,0343	0,0343	0,0360	0,0412	0,0360
Araguaia 1	0,0694	0,0684	0,0702	0,0702	0,0667	0,0738	0,0650	0,0667	0,0770	0,0684	0,0719	0,0684	0,0702	0,0702	0,0719	0,0736	0,0719
Araguaia 2	0,0642	0,0633	0,0650	0,0650	0,0616	0,0687	0,0599	0,0616	0,0753	0,0633	0,0667	0,0633	0,0650	0,0650	0,0667	0,0719	0,0667
Araguaia 3	0,0660	0,0651	0,0668	0,0668	0,0634	0,0705	0,0617	0,0634	0,0737	0,0651	0,0651	0,0651	0,0669	0,0668	0,0686	0,0703	0,0651
Araguaia 4	0,0432	0,0411	0,0428	0,0428	0,0411	0,0464	0,0411	0,0398	0,0531	0,0411	0,0445	0,0411	0,0428	0,0428	0,0445	0,0497	0,0445
Araguaia 5	0,0694	0,0684	0,0702	0,0702	0,0667	0,0738	0,0650	0,0667	0,0770	0,0684	0,0684	0,0684	0,0702	0,0702	0,0719	0,0702	0,0684
Araguaia 6	0,0607	0,0599	0,0616	0,0616	0,0582	0,0653	0,0565	0,0582	0,0719	0,0599	0,0633	0,0599	0,0616	0,0616	0,0633	0,0684	0,0633
Tocantins 1	0,0294	0,0291	0,0308	0,0273	0,0325	0,0017	0,0291	0,0273	0,0410	0,0291	0,0325	0,0291	0,0308	0,0308	0,0325	0,0376	0,0325

Haplótipos	Tapajós 1	Tapajós 2	Xingu 1	Xingu 2	Xingu 3	Xingu 4	Xingu 5	Araguaia 1	Araguaia 2	Araguaia 3	Araguaia 4	Araguaia 5	Araguaia 6	Tocantins 1
Tapajós 1														
Tapajós 2	0,01369													
Xingu 1	0,0240	0,0205												
Xingu 2	0,0309	0,0240	0,0240											
Xingu 3	0,0325	0,0256	0,0257	0,0017										
Xingu 4	0,0258	0,0224	0,0120	0,0120	0,0138									
Xingu 5	0,0257	0,0223	0,0017	0,0257	0,0274	0,0138								
Araguaia 1	0,0479	0,0616	0,0686	0,0790	0,0804	0,0742	0,0686							
Araguaia 2	0,0428	0,0565	0,0634	0,0738	0,0753	0,0690	0,0634	0,0085						
Araguaia 3	0,0445	0,0583	0,0653	0,0756	0,0771	0,0708	0,0653	0,0137	0,0051					
Araguaia 4	0,0377	0,0239	0,0412	0,0480	0,0497	0,0466	0,0429	0,0411	0,0325	0,0343				
Araguaia 5	0,0479	0,0616	0,0686	0,0789	0,0804	0,0742	0,0686	0,0136	0,0051	0,0068	0,0377			
Araguaia 6	0,0393	0,0530	0,0600	0,0703	0,0719	0,0655	0,0600	0,0119	0,0034	0,0051	0,0291	0,0085		
Tocantins 1	0,0359	0,0325	0,0292	0,0360	0,0376	0,0345	0,0309	0,0770	0,0719	0,0737	0,0497	0,0770	0,0684	

Tabela 7: Valores médios percentuais de média \pm desvio padrão da distância “p” para ATPase dentro e entre as populações de *P. aiereba*.

Populações	Calha	Rio Negro	Tapajós	Xingú	Araguaia
Calha	1,15 \pm 0,99				
Rio Negro	1,35 \pm 0,75	1,12 \pm 0,70			
Tapajós	2,41 \pm 0,35	2,55 \pm 0,0044	2,46 \pm 0,44		
Xingú	2,99 \pm 0,0036	3,45 \pm 0,42	2,54 \pm 0,38	3,03 \pm 0,73	
Araguaia	5,67 \pm 1,60	5,92 \pm 1,43	4,60 \pm 1,14	5,68 \pm 2,11	5,50 \pm 1,88

Os índices de variabilidade genética estão apresentados na tabela 8. Esses indicam que as populações analisadas possuem uma alta diversidade genética, variando de 0,7 a 1,0, com exceção da população do rio Xingu com um índice de diversidade genética igual a 0,591.

O resultado da Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou que existe uma maior variância dentro das populações/rios (70,93%), do que entre as populações/rios (29,07%) ($F_{st}=0,7093$; $P=0$). Essa estruturação dentro dos rios é corroborada pelos altos valores encontrados para o F_{st} (índice de fixação alélica) e Nm (número de migrantes). O F_{st} é uma medida indireta de fluxo gênico que varia de 0 a 1, quanto mais próximo de 1 menor é a permuta de material genético e maior a fixação de alelos na população. Já o Nm é número de migrantes por geração dentro de cada população, na tabela 9, pose-se observara que esses valores foram menores que um. A correlação entre distância genética e distância geográfica obtida pelo teste de Mantel não foi significativa, sendo o coeficiente

de correlação $r = 0.307$ e $P = 0,094$, o que indica que essa estruturação não é devido a distancia geográfica entre as populações.

Tabela 8: Índices de Polimorfismos de DNA para o fragmento de ATPase em populações de *P. aiereba*. N-número de seqüências, nH – número de haplótipos, S – sítios polimórficos, Hd – diversidade genética, π – diversidade nucleotídica.

Populações	Polimorfismos				
	N	nH	S	Hd	π
Calha	12	7	20	0,833	0,0076
Rio Negro	16	10	18	0,892	0,0054
Tapajós	2	2	8	1,000	0,0139
Xingú	19	5	16	0,591	0,0099
Araguaia	13	6	60	0,796	0,0251
Total	63	31	83	0,935	0,0347

Tabela 9: Valores de F_{st} abaixo e Nm acima encontrados entre as populações. * indica valores significativos de acordo com a correção de Bonferroni ($P \leq 0,005$)

Populações	Calha	Rio Negro	Tapajós	Xingú	Araguaia
Calha		0,8086	0,2934	0,2331	0,2157
Rio Negro	0,3820*		0,31366	0,15462	0,16978
Tapajós	0,6301	0,7337*		0,31366	0,52185
Xingú	0,6819*	0,7638*	0,6145		0,18011
Araguaia	0,6986*	0,7465*	0,4893	0,7351*	

5. DISCUSSÃO

A Região Controle do DNA mitocôndrial, ou alça D (D-Loop), é assim chamada porque controla a replicação da fita pesada (H) da mitocôndria. Essa região não expressa proteína, podendo acumular mutações sem conferir valor adaptativo aos organismos. Tal característica lhe proporciona uma alta taxa de substituição nucleotídica, em relação ao restante da mitocôndria, sendo um dos marcadores mais indicados em estudos de fluxo gênico, migração de indivíduos e populações (Solé-Cava, 2001; Balakrishnam *et al.* 2003; Martins *et al.* 2003).

Devido às características acima citadas, este estudo teve como proposta inicial trabalhar com a região D-Loop do DNAm de *Paratrygon aiereba*. Entretanto, não foi possível utilizar esse marcador, pois como já mencionado não foi possível seqüenciar o fragmento inteiro, além de não haver a certeza que o fragmento é homólogo ao D-Loop dos elasmobrânquios. Existem algumas evidências que a região seqüenciada era realmente o fragmento de D-Loop, como a porcentagem de nucleotídeos encontrados nas seqüências e o completo alinhamento delas, um total de 30 seqüências (21 fita L e 9 fita H). Isso não teria ocorrido se o fragmento seqüenciado fosse, por exemplo, um pseudogene ou contaminação de amostras.

Em algumas espécies de elasmobrânquios marinhos (*Scyliorhinus canicula*, *Mustelus manazo*, *Squalus acanthias*, *Raja radiata* e *Heterodontus francisci*) o DNAm varia de 16,707 a 16,783pb. Similar a outros vertebrados, dos treze genes codificadores, doze são encontrados na fita pesada (H), 22 tRNAs, 2 rRNAs e a região controladora (*D-Loop*) contêm aproximadamente 1000 a 1100pb (Heist, 2004). Em *Hexatrygon bickelli*, uma espécie de raia marinha da família Hexatrygonidae, ordem Miliobatiformes, mesma ordem da família Potamotrygonidae (McEarchran e Aschliman, 2004), a região controle possui aproximadamente 1350pb. Neste trabalho, o fragmento amplificado tem

aproximadamente 1800pb. Assim, existe uma possibilidade de que o fragmento seqüenciado neste trabalho seja realmente o *D-Loop*, já que esta família divergiu das espécies marinhas há aproximadamente 50 milhões de anos, no período do Eoceno, segundo Carvalho e colaboradores (2004), ou ainda no início do Período do Mioceno, 15 a 23 milhões de anos atrás (Lovejoy *et al.* 1998). Estes resultados merecem estudos adicionais, pois podem ajudar a elucidação de mecanismos moleculares operando em um tempo relativamente recente.

Há pouquíssimos dados e informações genéticas sobre a Família Potamotrygonidae, sendo que para o gênero *Paratrygon* são praticamente inexistentes. Os resultados obtidos para esse fragmento foram semelhantes aos obtidos para ATPase. Apesar das árvores de parcimônia não estarem enraizadas, a relação dos haplótipos encontrados no rio Araguaia foi monofilética tanto para a fita L, quanto para a fita H, separando os rios Negro, Araguaia e Xingu. Os índices de divergência genética nesse rio foram altos quando comparados ao Rio Negro, assim como os resultados encontrados para o fragmento de ATPase, onde o rio Araguaia apresentou os mais altos valores de divergência genética.

Para o fragmento de ATPase foi possível obter seqüências das cinco localidades propostas. As análises filogenéticas indicam que as populações de *Paratrygon aiereba*, encontram-se separadas em dois grandes grupos: (1) um grupo com as populações do rio Negro e do sistema Solimões-Amazonas (Calha), (2) e outro, com as populações dos afluentes do médio-baixo rio Amazonas, formadas pelas populações dos rios Tapajós, Xingu e Araguaia.

Essa relação de separação em grupos monofiléticos entre a Calha, rio Negro e os afluentes do médio-baixo Amazonas também foram observadas por Hubert e Renno (2006) analisando 345 espécies de characiformes. Utilizando a análise de parcimônia de endemicidade (PAE), esse autores, encontraram 11 áreas de endemismo, entre elas houve a

formação de dois grupos monofiléticos, um denominado baixo Amazonas, áreas que correspondem ao rio Amazonas, baixo Rio Negro, baixo rio Madeira e rio Branco, e outro grupo denominado Xingu-Tocantins, correspondentes aos rios Tocantins, Araguaia, Xingu e Tapajós.

Em relação aos haplótipos houve uma tendência desses se agruparem dentro dos rios, sendo que cada rio amostrado formou um grupo monofilético, principalmente em relação aos rios Xingu e Araguaia. Estes agrupamentos ficam bem evidente quando observadas as árvores de haplótipos: somente os locais de coleta Negro e Calha possuem haplótipos interligados e os rios Tapajós, Xingu e Araguaia apresentam árvores segregadas.

A população que apresentou a maior divergência genética em relação às outras foi a do rio Araguaia. Isso pode ser um indicativo que esta população está a mais tempo isolada do restante ou que o Araguaia contém mais de uma unidade populacional. Essa afirmação é corroborada pelos altos valores de F_{st} e os baixos valores de N_m , que mostram que o fluxo gênico é restrito ou inexistente, não só para a população do rio Araguaia, como também para as outras populações.

A fragmentação das árvores de haplótipos também é um indicativo do baixo intercâmbio de material genético entre estas populações. Assim, as populações, principalmente, dos afluentes do médio-baixo Amazonas estão restritas aos rios onde ocorrem, estando geneticamente separadas por longos períodos de tempo.

A Família Potamotrygonidae está distribuída por toda a Região Neotropical, mas a maioria de suas espécies possui uma distribuição restrita a uma bacia hidrográfica. A espécie *P. aiereba*, representa uma exceção a este padrão distribuindo-se amplamente por toda a bacia Amazônica e bacia do rio Orinoco (Carvalho *et al.* 2003). Entretanto, analisando em dados morfológicos, Charvet-Almeida *et al.* (2005) consideraram o gênero

Paratrygon, antes descrito como monotípico, como um complexo de pelo menos três espécies diferentes, indicando que a distribuição geográfica registrada para a espécie não corresponde à realidade. No presente trabalho, existe um indicativo que pode haver mais de uma espécie, isto é devido à alta divergência genética encontrada para a população do rio Araguaia em relação às demais. Mas, esses resultados devem ser investigados juntamente com dados morfológicos desse grupo, pois existem fortes indicativos genéticos de que essa população seja um grupo diferenciado dentro de *P. aiereba*, uma unidade geneticamente diferenciada.

O mesmo padrão divergência genética identificado neste trabalho foi relatado por Silva e Patton (1998) para duas espécies de pequenos mamíferos, *Proechimys steerei* e *Micoureus demerare*, com uma divergência intra-populacional, utilizando o como marcador o Citocromo b, foi de 6% e 5,2 a 8,7%, respectivamente. Segundo esses autores, essas linhagens são muito antigas, com a divergência entre essas populações sendo possivelmente do final do Período do Mioceno.

Utilizando os genes mitocôndrial Citocromo B e nuclear RAG 1, para comparar sete espécies de tubarões com seres humanos, camundongos e marsupiais, o trabalho de Martin (1999) mostrou que o DNAm de tubarões evolui a uma taxa aproximadamente nove vezes menor que aquela de mamíferos, com uma taxa média de substituição de $1,6 \times 10^{-10}$ substituições/sítio/ano em tubarões, quanto que em mamíferos é de $19,3 \times 10^{-10}$ substituições/sítio/ano. Extrapolando essa informação para as raias de água doce (elasmobrânquios como os tubarões), a origem da divergência encontrada para a população de *P. aiereba* no rio Araguaia pode ser também muito antiga. Essa divergência pode datar do mesmo período geológico referido por Silva e Patton (1998) pois, a origem desse grupo é muito antiga aproximadamente 50 milhões de anos, período do Eoceno (Carvalho *et al.*, 2004) ou 20 milhões de anos, período do Mioceno (Lovejoy *et al.*, 1998). Entretanto, no

presente trabalho não foi feito relógio molecular a fim de estimar o tempo de divergência entre essas populações.

Muitos trabalhos de filogeografia em peixes têm mostrado que o período do Mioceno foi muito importante para a modelagem da distribuição e formação da ictiofauna Neotropical (Lovejoy *et al.*, 1998 e 2006, Lundberg *et al.*, 1998, Hubert e Renno, 2006, Albert *et al.*, 2006). Foi nesse período houve a formação dos Andes e conseqüentemente a formação dos arcos tectônicos influenciou na modelagem dos tributários do sistema Solimões-Amazonas (Lundberg *et al.*, 1998, Hubert e Renno, 2006). Existem alguns estudos sobre a hipótese arcos tectônicos atuar como barreira geográfica separando alguns grupos organismos terrestres como, pequenos mamíferos (Silva e Patton, 1998) e em anfíbios (Lougheed *et al.*, 1999).

Setenta e um por cento dos trabalhos utilizando evidências filogeográficas sugerem os eventos de especiação tiveram início por separação geográfica em duas ou mais populações (Brooks *et al.* 1992). Entretanto, não existe estudo estudos sobre o efeito dos arcos na formação da ictiofauna Neotropical, e também não há evidencia de que esses arcos chegaram a ficar expostos a ponto de separar as bacias de drenagem.

Uma das hipóteses que poderia explicar o padrão genético encontrado nesse trabalho é que com a formação dos tributários, pode ter ocorrido uma fragmentação na população. O estabelecimento da geomorfologia dos rios pode ter atuado como um evento vicariante que ajudando na fragmentação e fazendo com que essas populações perdessem o contato. Além disso, devido ao aspecto biológico da espécie, como ciclo reprodutivo lento, e ao evento ocorrido ser muito antigo, essas populações conseguiram acumular algumas mutações para se diferenciarem geneticamente, mas pode ser que esse processo ainda esteja ocorrendo. Pois, somente na população do rio Araguaia essa divergência é maior

(Tabela7), o que pode ser dividido ao isolamento geográfico pela distância em relação às outras populações.

Além disso, os resultados deste trabalho também indicaram que o fluxo gênico não existe, ou é restrito entre as populações das localidades estudadas, um indicativo de que essa espécie não percorre grandes distâncias, podendo levar a um maior isolamento. Assim, o nível de variação genética inter e intra populacional é muito relevante para qualquer espécie manter a vitalidade reprodutiva, a resistência a doenças e a habilidade para se adaptar a mudanças ambientais. Uma vez que a diversidade das espécies representa o alcance das adaptações evolutivas e ecológicas em relação a determinados ambientes, estudos de filogeografia também podem gerar subsídios para a conservação de organismos (Primack & Rodrigues, 2001).

A caracterização da estrutura genética e história evolutiva das populações através de técnicas moleculares é uma parte importante dentro da genética da conservação (Silva *et al.*, 2004). Neste sentido, a associação do DNAmt à filogeografia, tem levado a um melhor entendimento sobre a distribuição geográfica, relações filogenéticas e distâncias entre linhagens evolutivas, permitindo um melhor entendimento sobre a biogeografia da região e áreas de endemismo (Bermingham & Mortiz, 1998).

Interações de processos como seleção natural, deriva genética, mutação e migração, juntamente com pressões ambientais, podem resultar em grandes populações amplamente distribuídas com tendência a altos níveis de diversidade genética ou ainda, populações pequenas, isoladas e de espécies ameaçadas, que normalmente possuem esses níveis mais baixos (Frankhan *et al.* 2002).

Um dos fatores que podem contribuir para a diminuição da diversidade genética de uma população e/ou espécie é a sua exploração. Uma vez que a diversidade genética pode ser influenciada por mutações deriva genética, mudanças no ambiente, e migração de

indivíduos entre populações, a manutenção dessa diversidade é necessária para que as populações evoluam e se adaptem as mudanças ambientais, um processo contínuo na natureza. Logo, populações pequenas, em ilhas, ou ameaçadas, normalmente reduzem níveis de diversidade genética, pois acabam perdendo-a ao longo do tempo (Frankham *et al.* 2003).

No Estado do Amazonas, as raias de água doce são exploradas tanto pela pesca ornamental, servindo como objeto de aquarismo e exportação para a Europa, EUA e Japão, como pela pesca artesanal, servindo como alimento em vários locais da bacia amazônica. Ao longo do sistema Solimões-Amazonas, elas também sofrem com a pesca comercial em grande escala, onde são acidentalmente capturadas em redes malhadeiras (Araújo *et al.*, 2001).

No rio Negro, as espécies da Família Potamotrygonidae geram renda para as comunidades humanas locais, sendo exploradas pela pesca ornamental, indústria que movimentava milhões de reais/ano no Estado do Amazonas. No final da década de 90, foi proibida a pesca e comercialização das raias neste Estado. Entretanto, essa medida foi revista e, em junho de 2003, foi lançada uma portaria do IBAMA (Nº 036/03) que regulariza quotas anuais para exportação de apenas sete espécies desta família, proibindo a comercialização de *Paratrygon aiereba*. Essa medida foi tomada a fim de proteger essa espécie, inviável de ser mantida sobre pressão antropogênica, já que devido a sua baixa abundância é considerada uma das espécies de raias mais vulneráveis da Amazônia (Araújo *et al.*, 2001). Em setembro de 2006 saiu uma nova portaria do IBAMA proibindo a pesca de qualquer espécie da família Potamotrygonidae para comercialização como ornamental, entretanto, essa medida não se refere a comercialização com outros fins, como alimentício.

Para a Calha Solimões-Amazonas, existe uma maior vulnerabilidade de *P. aiereba* pela ocorrência local dos maiores indivíduos desta espécie, a maior da Família Potamotrygonidae, atraindo, assim, a indústria pesqueira. Entretanto, as raias de água doce não sofrem apenas por sua captura para servir como fonte de subsistência e/ou geração de renda, mas também pela sua pesca indiscriminada no período da seca, onde a redução e isolamento de habitats as tornam mais susceptíveis à captura e predação. Nesta época, é muito comum no baixo rio Negro, a prática da “limpeza”, isto é, a remoção de todas as raias encontradas nas praias a fim de prevenir acidentes com banhistas, com estimativas de captura de até 21 mil indivíduos num só ano na região Amazônica (Araújo *et al*, 2001). Além disso, é muito comum encontrar esses animais mutilados pela retirada da cauda onde se encontra o ferrão de defesa, tornando-os mais vulneráveis à predação, dificultando sua natação e comprometendo todas as atividades dependentes deste comportamento.

Esse conjunto de pressões antrópicas exercidas sobre as raias de água doce amazônicas, aliado as características reprodutivas de *Paratrygon aiereba*, faz com que esses animais sejam muito vulneráveis sob o ponto de vista de sua conservação. Além disso, mesmo com o aumento da atenção que essa espécie vem recebendo devido às argumentações de que seja composta por um complexo de espécies (Charvet-Almeida *et al.*, 2005), estudos sobre a sua biologia ainda são escassos e sobre a ecologia e estrutura de suas populações, dispersão e migração, são praticamente inexistentes.

Devido aos modelos obtidos neste trabalho sobre a estruturação genética e fluxo gênico de *P. aiereba* na Amazônia, ao se tratar de estratégias e ações voltadas para conservação e manejo dessa espécie, sugerimos que as populações das localidades analisadas sejam tratadas como unidades separadas, considerando as diferenças em suas características populacionais, ambientais e pressões antropogênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert, J.S., Lovejoy, N.R., Crampton, W.R.G. 2006. Miocene tectonism and the separation of cis - and trans – Andean rivers basin: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Science*. 1 – 14.

Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: A personal reflection. *Molecular Ecology*. 7: 371-379.

_____. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press. 439p.

Araújo, M.L.G. 1998. *Biologia reprodutiva e pesca de Potamotrygon sp (Chondrichthyes-Potamotrigonidae) no médio Rio Negro, Amazonas*. Dissertação de Mestrado. Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade Federal do Amazonas, 171p.

Araújo, M.L.G., Charvet-Almeida, P., Almeida, M.P., Pereira, H. 2001. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and challenges. *AC 20. Inf 8*.

Ayres, J.M. 1995. *As matas de Várzea do Mamirauá*. Tefé, AM. Sociedade Civil Mamirauá. 140p.

Balakrishnam, C.N., Monfort, S.L., Gaur, A., Singh, L., Sorenson, M.D. 2003. Phylogeography and conservation genetics of Eld's deer (*Cervus eldi*). *Molecular Ecology*. 12, 1-10.

Barthem, R. 2001. Componente biota aquática. In: Capobiano, J.P.R., Veríssimo, A., Moreira, A., Sawyer, D., Santos, I., Pinto, L.P. (org). *Biodeiversidade na Amazônia Brasileira*. Instituto Socioambiental. São Paulo. 60-73.

Barthem, R., Goulding, M. 1997. Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes Amazônicos. Tefé, AM. Sociedade Civil Mamirauá, 123p.

Batista, J.S., Alves-Gomes, J.A. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes – Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research*. 5 (4): 723-740.

Bermingham, E., Martin, A.P. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of Neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*. 7, 499-517.

Bermingham, E., Mortiz, C. 1998. Comparative phylogeography concepts and applications. *Molecular Ecology*. 7, 367-369.

Brooks, D.R., McLennan, D.A. 1991. *Phylogeny, Ecology and Behavior: A research program in comparative biology*. University of Chicago, 434p.

Brown, W.M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonucleases analysis. *Proceedings of National Academy of Science*, 77: 3605-3609. 13

_____. 1981. Mechanisms of evolution in animal mitochondrial DNA. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 361: 119-134.

Carvalho, M.R., Lovejoy, N.R., Rosa, R.S. 2003. Family Potamotrygonidae (River Stingrays). In: Reis, R.E., Sven, O, Kullander, C.J., Ferraris, Jr. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS. Porto Alegre - RS. p. 22-28.

Carvalho, M. R. de ; Maisey, John G ; Grande, Lance . Freshwater stingrays of the Green River Formation of Wyoming (Early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Bulletin of The American Museum Of Natural History*, Nova York, v. 284, p. 1-136, 2004.

Charvet-Almeida, P., Rosa, R., Almeida, M.P. 2005. *Paratrygon aiereba*: a multi-species complex (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Abstract Book, Joint meeting of ichthyologists and herpetologists, Florida, USA. p. 92.

Charvet-Almeida, P. 2001. Ocorrência Biologia e Uso das Raias de água doce na Baía de Marajó (Pará-Brasil), com ênfase na biologia de *Pleisiotrygon iwamae*

(Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará e Museu Emílio Goeldi, 213p.

Clemente, M., Posada, D., Crandall, K.A. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9 (10):1657-1660.

Dunn, K., McEarchran, J.D., Honeycutt, R.H. 2003. Molecular phylogenetics of myliobatiform fish (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with comments on the effects of missing data on parsimony and likelihood. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 27. 259-270.

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

Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Ashley, M.V. 2001. Population structure of the shark (*Negaprion brevirostris*) in the western atlantic: DNA microsatellite variation. *Molecular Biology*. 10, 295-303.

Felsenstein, J.F. 1981. Evolutionary tree from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17: 368-376.

Formiga-Aquino, K. 2004. Variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) (Valenciennes, 1840) (Siluriformes: Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões. Dissertação de mestrado. INPA/UFAM, Manaus, Amazonas. 75p.

Frankham, R., BALLOU, J.D. BRISCOE, D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. UK.

_____, 2003. Genetics and Conservation Biology. Comptes Rendus Biologies. 326. p 22-29.

Goulding, M., Carvalho, M.L., Ferreira, E. 1988. Rio Negro, Rich Life in Poor Water: Amazonian diversity and Floodplain Ecology as Seen Through Fish Communities. SPB Academic Publishing, Netherlands. p. 199

Goulding, M., Barthem, R., Ferreira, E.J.G. 2003. The Smithsonian Atlas of Amazon. Smithsonian Books, Washington, D.C.

Heist, E.J. 2004. Genetics of Sharks, Skates and rays. In: Carrier, J.C., Musick, J.A., Heithaus, M.R. Biology of sharks and their relatives. CRC Press, London. p. 471-485.

Henning, W. 1966. Phylogenetics Systematics. University of Illinois Press, Urbana, 263pp.

Hinch, S.G., Collins, N.C., 1993. Relationships of littoral fish abundance to water chemistry and macrophyte variables in Central Ontario lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci, 50:1870-78.

Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G.A., Lorente, M.A. 1995. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene north south América. *Geology*. 23, 237 - 240.

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

Humphries, C.J., Pareti, L.R. 1986. *Cladistic Biogeography*. Oxford Monographs on Biogeography n° 2. Clarendon Press, Oxford. 96p. 14

Lasso, C.A., Rial, A.B., Lasso-Alcalá. 1996. Notes of the biology freshwater stingrays *Paratrygon aerebia* (Müller e Henle, 1841) and *Potamotrygon orbigny* (Castelnau, 1855) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Venezuelan llanos. *Aqua Journal f Ichthyology and Aquatic Biology*, 2(3); 39-52.

Lougheed, S.C., Gascon, C., Jones, D.A., Borgart, J.P., Boag, P.T. 1999. Ridges and Rivers: A test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of Royal Society of London*, 266, 1829-1835.

Lovejoy, N.R. 1996. Systematics of myliobatoid elasmobranch: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of the neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zoological Journal Linnean Society*. 117: 207-257.

Lovejoy, N.R., Bermingham, E., Martin, A.P. 1998. Marine incursion into South America. *Nature*, 369: 421-422.

Lovejoy, N.R., Araújo, M.L.G. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology*. 9: 259-268.

Lovejoy, N.R., Albert, J.S., Crampton, W.G.R. 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South America Earth Sciences*. 1 – 9.

Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M.C.S.L., Wesselingh, F. 1998. The stage of neotropical fish diversification: A history of tropical south America rivers. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre. 13 – 48.

Lundberg, J.G. 1998. The Temporal context for the diversification of Neotropical Fishes. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre. 49-68.

Martin, A. 1995. Mitochondrial DNA sequence Evolution in sharks: Rates, patterns and phylogenetic inferences. *Molecular Biology Evolution*. 12(6): 1114-1123.

_____, 1999. Substitution Rates of Organelle and Nuclear Genes in Sharks: Implicating in metabolic rate (again). *Molecular Biology and Evolution*, 16 (7). 996-1002.

Martins, C., Wasko, A.P., Oliveira, C, Foresti, F. 2003. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná Rives Basin. *Genetics and Molecular Biology*. 26. 1, 33-38.

McEachran, J., Aschliman, N. 2004. Phylogeny of Batoidea. In: Carrier, C.J., Musick, J.A., Heithaus, M.R. (eds). *Biology of Sharks and Their relatives*. CRC. Press, London. 79 -113.

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

Palumbi, S.R. 2001. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis, D., Mortiz, G., Mable, B. *Molecular Systematics*. 2^oed. Press. USA.

Pianka, E. R. 1982. *Ecologia evolutiva*. Ediciones Omega, Barcelona, Spain. 365 pp.

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

Primack,R.B., Rodrigues, E. 2001. Biologia da Conservação. Ed Vida, Londrina, PR. 328pp.

Rickefs, R.E., 1993. A Economia da Natureza. 3º Ed. Editora Guanabara Koogan S.A. p. 470.

Rozas, J., Sánchez-CelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.

Schmitt, Renata. 2006. Filogeografia de *Hypopygus lepturus* Hoedeman, 1962 (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) ao longo do médio rio Negro, Amazônia. Dissertação de mestrado. INPA/UFAM, Manaus, Amazonas.

Silva, M.N., Patton, J. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. Molecular Ecology. 7, 475-486.

Sinvansundar, A., Bermingham, E., Ortí, G. 2001. population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South America rivers. Molecular Ecology. 10, 407 – 417.

Sioli, H. 1985. Amazônia: Fundamentos da Ecologia da maior região de Florestas

Tropicais. Vozes, Petrópolis -RJ. 79p.

Solé-Cava, A.M. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S.R.(ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Holos, Ribeirão Preto. p. 172-192.

Swofford, D.L. 1999. PAUP: Phylogenetic Analysis using parsimony, version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland.

Vari, R.P., Malabarba, L.R. 1998. Neotropical Ichthyology: Na Overview. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre. 1 – 12.

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., & Miller W. (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

ANEXOS

Anexo 1

Protocolo Extração de DNA com Fenol (modificado de Sambrook):

1. Picar 200mg de tecido muscular
2. Adicionar 500uL de tampão de lise
3. Adicionar 20uL de proteinase K
4. Adicionar 15uL de RNase
5. Incubar a 45°C over night, até digerir o tecido
6. Adicionar 500uL de fenol. Agitar 5min (movimentos leves ou vortex).
Centrifugar 5 min a 6000rpm. Retirar o sobrenadante e repetir a operação.
7. Adicionar 500uL (ou 1 volume) de fenol – clorofórmio - álcool isoamílico (25:24:1). Agitar 5 min. Centrifugar 5 min (6000 rpm). Retirar o sobrenadante e repetir a operação.
8. Adicionar 500uL de clorofórmio - álcool Isoamílico (24:1). Agitar 5 min.
Centrifugar 5 min (6000 rpm). Retirar o sobrenadante. Repetir a operação.
9. Adicionar 1mL de etanol 100%. Deixar a -20°C over night. Centrifugar a 6000 rpm por 30 min. Descartar o sobrenadante e adicionar 200uL de etanol 70%.
Centrifugar 14000 rpm por 30min . Deixar secar e ressuspender em 50uL de TE 1X (1:4). Deixar eluindo over nighth. Correr em gel de agarose 0.8%.

Tampão:

50mM Tris-HCL, pH 8.0

10mM EDTA, pH 8.0

1% SDS

1% β -mercaptanol

Anexo 2

Condições de amplificação D-Loop e ATPase:

As concentrações dos reagentes descritas abaixo são para serem utilizadas para um volume final de solução de 25ul

- dNTP mix: 0,3mM
- *primers*: 0,3mM (cada)
- MgCl₂: 3mM
- Taq polimerase: 1U
- DNA aproximadamente 50ng
- Água para completar o volume de 25ul

Perfil de temperatura:

- desnaturação 94°C por 4 min
- anelamento 53 °C por 1 min – D-Loop
- anelamento 50 °C por 1 min - ATPase
- extensão 72 °C por 1min 30 seg
- 35 ciclos
- extensão final de 72 °C por 5 min

Anexo 3

Purificação enzimática do produto de PCR:

A purificação é realizada por duas enzimas Exonuclease I / Shrimp Alkaline Phosphatase (ExoSAP-I).

- Em 3uL do produto do PCR é colocado 1uL do mix das duas enzimas ExoSAP-I.

- O mix PCR + ExoSAP é incubado por 15 min a 37°C e 15 min a 80°C.

Após esse procedimento a o DNA já estará limpo para ser utilizado na reação de seqüenciamento.

Anexo 4

Reação de Seqüenciamento:

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit (GE – Health Care)*

Fazer uma reação com solução final de 10uL

- 1.1. 2uL do pré mix
- 1.2. 1uL de *primer* (5 pmol) de cada
- 1.3. 4ul do purificado
- 1.4. completar com água milliQ para 10uL
- 1.5. Dar um spin na placa

Colocar no termociclador ser processados:

- 30 ciclos
- desnaturação 94°C por 20seg
- anelamento 50°C por 15seg
- extensão 60°C por 1min e 20seg

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)