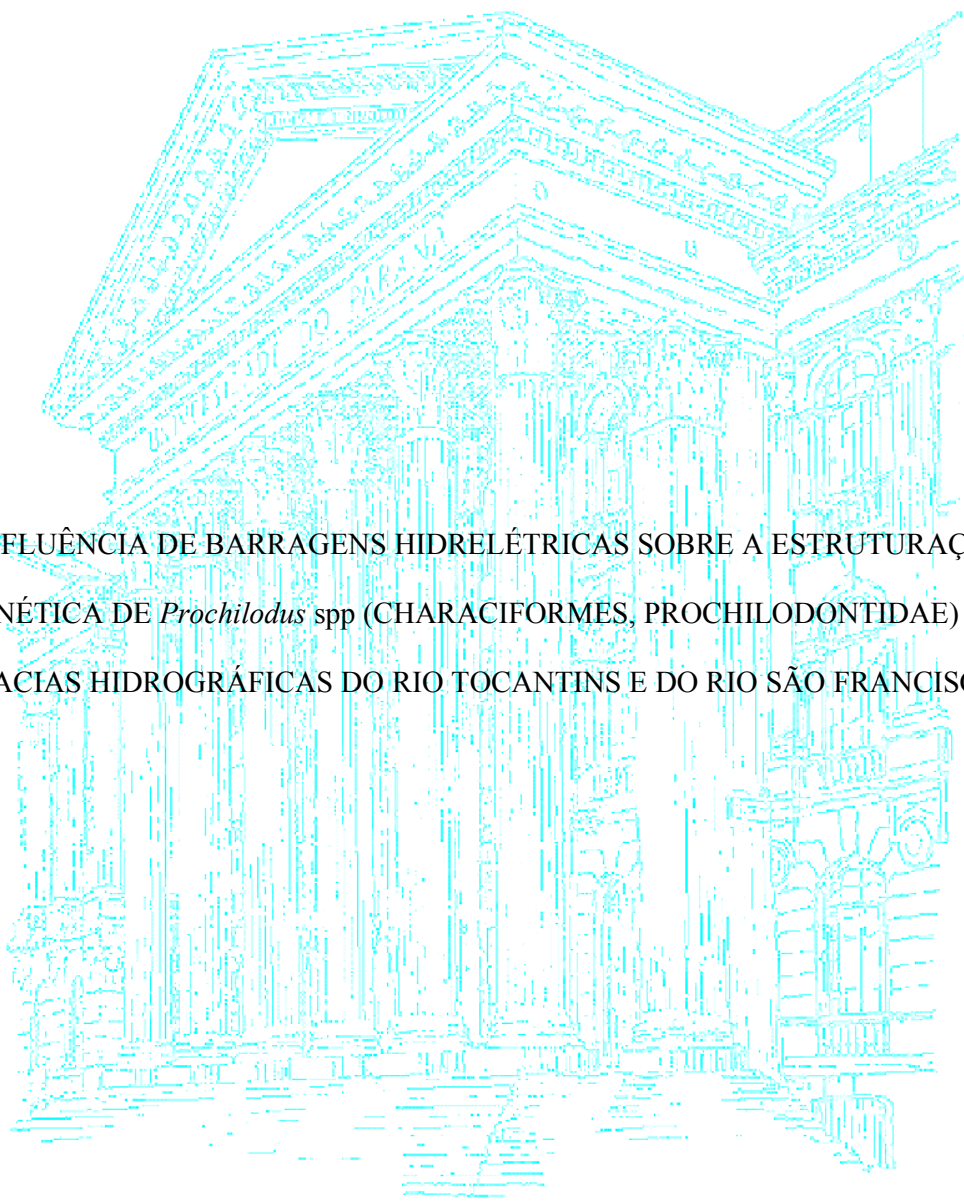


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIO MIRANDA MARTELETO



INFLUÊNCIA DE BARRAGENS HIDRELÉTRICAS SOBRE A ESTRUTURAÇÃO
GENÉTICA DE *Prochilodus* spp (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE) NAS
BACIAS HIDROGRÁFICAS DO RIO TOCANTINS E DO RIO SÃO FRANCISCO.

CURITIBA

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIO MIRANDA MARTELETO

INFLUÊNCIA DE BARRAGENS HIDRELÉTRICAS SOBRE A ESTRUTURAÇÃO
GENÉTICA DE *Prochilodus* spp (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE) NAS
BACIAS HIDROGRÁFICAS DO RIO TOCANTINS E DO RIO SÃO FRANCISCO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de concentração Zoologia. Orientador: Walter Antonio Pereira Boeger PhD.

CURITIBA

2011


Termo de aprovação

INFLUÊNCIA DE BARRAGENS HIDRELÉTRICAS SOBRE A ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE
Prochilodus spp (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE) NAS BACIAS HIDROGRÁFICAS
DO RIO TOCANTINS E DO RIO SÃO FRANCISCO.

Por

FLÁVIO MIRANDA MARTELETO

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores



Dr. Walter Antonio Pereira Boeger - UFPR
Presidente e Orientador



Dr. Alexandre Lima Godinho - UFMG



Dr. Paulo de Tarso da Cunha Chaves - UFPR

Curitiba, 28 de fevereiro de 2011.

“No amount of experimentation can prove me right;
a single experimentation can prove me
wrong.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A confecção deste trabalho não seria possível sem a colaboração direta e indireta de muitas pessoas.

Quero agradecer em primeiro lugar ao meu Orientador Walter Antonio Pereira Boeger, sem o qual seria impossível o término desta empreitada. Agradeço as dicas, sugestões e puxões de orelha ao longo destes cinco anos de colaboração. E espero que se prolonguem por muitos anos mais.

Agradeço também aos meus pais e avós, tios e primos pelo apoio incondicional nesses 26 anos de vida. Sou o que sou, em grande parte, por causa de vocês e pelas experiências que passamos juntos. Devo tudo à educação privilegiada que eu tive dentro de casa, que me permitiu evoluir muito fora dela.

Agradeço muito à minha amada Carolina que esteve ao meu lado sempre que eu precisei, nos quase cinco anos que estamos juntos. Ela que foi meu apoio nos momentos de cansaço mental e nunca deixou de me incentivar nos momentos de incerteza. Construimos nosso amor com base na confiança e no companheirismo e assim ele resistirá para sempre.

Não posso deixar de agradecer a todos com quem compartilhei cinco anos de trabalho árduo, alegrias e tristezas no Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva – LEMPE. Esse trabalho contém um pedacinho de cada um de vocês: Luciana (Lulu), Raphael (Fifito), Baggio (Baggito), José Francisco (Zé), Rodrigo (O Mentira), Marlus, Renata (também conhecida por Jú), Mariana (Mari) e Sérgio. Aos não mais presentes no Laboratório: Marcel, Letícia (Let's), Rogério (Sargento Viana), Diogo (Escova) e Renan, que também tiveram papel fundamental no meu crescimento profissional e pessoal. Devo muito a todos vocês, e agradeço de coração pela amizade e companheirismo.

Agradeço a todos que ajudaram e deram suporte técnico nas coletas, principalmente ao Marcelo Chammas e a toda a equipe da Aquatrix e a Kenia Marcelino, gerente de

desenvolvimento territorial da CODEVASF e a toda equipe, que coletaram no São Francisco. Quero agradecer de novo ao Raphael que organizou as coletas no rio Tocantins e foi pra lá sozinho pra conseguir as amostras. Agradeço também ao professor Osvaldo Oyakawa, do museu de zoologia da USP, que foi responsável pela identificação do material coletado no São Francisco.

Agradeço também aos membros da banca que atenderam prontamente o convite para participar da avaliação do trabalho, Professores Doutores Alexandre Lima Godinho, Paulo de Tarso da Cunha Chaves e Vinícius Abilhoa e pelo debate das idéias aqui propostas bem como pelas sugestões bastante proveitosas para o engrandecimento desta dissertação. Por fim, agradeço ao curso de Pós Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Paraná, ao CNPq e ao Instituto GIA sem os quais esse trabalho não seria viável.

SUMÁRIO

Epígrafe.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Introdução.....	1
Material e Métodos	
Coleta do material.....	7
Procedimento molecular.....	8
Identificação molecular.....	9
Genética Populacional.....	10
Resultados	
São Francisco.....	14
Tocantins.....	15
Discussão	
Análises moleculares.....	18
Inércia Genética.....	20
Implicações.....	26
Referências Bibliográficas.....	28
Figuras.....	38
Tabelas.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa com a distribuição espacial aproximada dos pontos de coleta ao longo do rio São Francisco	38
Figura 2. Mapa com a distribuição espacial dos pontos de coleta a montante e a jusante da barragem da UHE de Tucuruí no Rio Tocantins.....	39
Figura 3. Árvore esquemática do relacionamento filogenético observado entre as seqüências de D-loop analisadas para as espécies de <i>Prochilodus</i> nas diferentes bacias hidrográficas.....	40
Figura 4. Rede de haplótipos de <i>Prochilodus argenteus</i> , mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos encontrados no rio São Francisco.....	41
Figura 5. Gráfico das distribuições das diferenças pareadas (<i>Mismatch Distribution</i>) com todas as amostras de <i>P. argenteus</i> de localidades agrupadas.....	42
Figura 6. Bayesian Skyline Plotting para a População de <i>Prochilodus argenteus</i> no Rio São Francisco.....	43
Figura 7. Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de <i>Prochilodus nigricans</i> encontrados no rio Tocantins.....	44
Figura 8. Gráfico das distribuições das diferenças pareadas (<i>Mismatch Distribution</i>) para o fragmento Região Controladora do DNA mitocondrial (D-loop) de <i>P. nigricans</i>	45
Figura 9. Bayesian Skyline Plotting para a População de <i>Prochilodus nigricans</i> no Rio Tocantins.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Usinas Hidrelétricas estudadas no Rio São Francisco e suas datas implantação.....	47
Tabela II. Número de indivíduos de <i>P. argenteus</i> coletados e coordenadas dos pontos amostrais do Rio São Francisco.....	48
Tabela III. Informações referentes aos indivíduos de <i>P. nigricans</i> amostrados no Rio Tocantins.....	49
Tabela IV. Nomes e respectivas seqüências de nucleotídeos dos primers utilizados na amplificação da região controladora (D-Loop).....	50
Tabela V. Número de indivíduos seqüenciados de <i>Prochilodu argenteus</i> (n), número de haplótipos (nh) e diversidade de nucleotídeos (π) apresentados pelas subpopulações nos nove pontos de coleta, assim como em todos os pontos juntos.....	51
Tabela VI. Análise de variância molecular (AMOVA) para as populações de <i>P.</i> <i>argenteus</i>	52
Tabela VII. Valores obtidos através dos testes de neutralidade seletiva para <i>P.</i> <i>argenteus</i>	53
Tabela VIII. Número de indivíduos seqüenciados de <i>Prochilodus nigricans</i> (n), número de haplótipos (n_h) e diversidade de nucleotídeos (π) em cada ponto de coleta, assim como nos pontos amostrais em conjunto.....	54
Tabela IX. Resultado da AMOVA realizada com dados haplotípicos das populações de <i>Prochilodus nigricans</i>	55
Tabela X. Valores obtidos através dos testes de neutralidade seletiva para <i>Prochilodus</i> <i>nigricans</i>	56

RESUMO

O crescente avanço econômico e social pelo qual o Brasil vem passando gerou uma grande necessidade de energia elétrica para suprir essa demanda. Esse desenvolvimento impulsionou iniciativas governamentais para ampliar o crescimento econômico, como a criação do Programa de Aceleração do Crescimento – PAC. No país a principal fonte de energia é oriunda de Usinas Hidroelétricas que causam impactos ambientais bastante severos em sua implantação. Mesmo com as vantagens substanciais para a geração de energia os impactos causados pela fragmentação populacional podem ser bastante severos, causando diminuição no número de indivíduos, pela simples mudança de habitat na formação dos reservatórios, e impactos na estrutura genética das populações isoladas. Essa fragmentação reduz a diversidade genética, interrompe o fluxo gênico entre populações, aumenta a diferenciação genética entre os isolados populacionais e em casos mais graves pode gerar extinção local. O presente trabalho buscou identificar padrões gerais de alteração da variabilidade e estrutura genética, causado pela implantação de hidroelétricas, nas populações de *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus nigricans* nos rios São Francisco e Tocantins respectivamente. Para tanto fragmentos da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) foram amplificados e seqüenciados de nove populações ao longo do rio São Francisco a montante e a jusante das principais barragens em seu curso, e de duas populações no Rio Tocantins a montante e a jusante da hidroelétrica de Tucuruí. Os resultados mostraram não haver ainda sinais de estruturação genética entre os isolados populacionais. A análise do passado demográfico mostrou que as populações das duas espécies de *Prochilodus* vêm passando por expansões populacionais desde o Pleistoceno, e os índices de diversidade genética analisados obtiveram resultados muito altos. Mesmo que estes resultados sugiram ausência de impacto genético, eles precisam ser analisados com cuidado. Sugerimos que um delicado balanço entre o tamanho populacional, o tamanho dos fragmentos analisados, o tempo decorrido desde a

fragmentação, o tempo de geração das espécies e a migração entre as populações são responsáveis pela homogeneização populacional encontrada. Esses fatores devem ser analisados para efetuar manejo correto de espécies impactadas.

ABSTRACT

The late economic and social progress experienced in Brazil generated a great need for electricity. This process prompted government initiatives to increase economic growth, like the creation of the Growth Acceleration Program (Programa de Aceleração do Crescimento – PAC). The country's main source of energy comes from hydroelectric power plants that cause severe environmental changes when deployed. The impacts caused by population fragmentation in a river can be quite severe, causing a decrease in the number of individuals with this habitat change by the introduction of the water reservoir. Also the built of a barrier can inflict impacts on population genetic structure. The fragmentation reduces genetic diversity and stops gene flow among populations. These factors may increase the genetic differentiation in the isolated populations and in severe cases leads to local extinction. This study sought to identify general patterns of impact on the variability and genetic structure in stocks of *Prochilodus argenteus* and *Prochilodus nigricans* in the São Francisco River and Tocantins River respectively. We sought to help defining strategies for management of populations affected by isolation. Fragments of the mitochondrial DNA control region (D-loop) were amplified and sequenced from nine different populations along the São Francisco River upstream and downstream of major dams on its course. We also analyzed two different populations in the Tocantins River upstream and downstream Tucuruí hydroelectric power plant. The results showed no signs of genetic structure among isolated populations in both rivers, which acts such as a great panmitic populations inside each river. The analysis of their demographic past showed that populations of the two species of *Prochilodus* studied are undergoing expansion since the Pleistocene, and the obtained genetic diversity indexes were very high. Even though these results suggest the absence of genetic impact, they must be carefully analyzed. We suggest that a delicate balance between population's size, size of the fragmented habitats, time of fragmentation, species generation time and migration are

responsible for the homogenization found. The intricate pattern formed by these factors must be observed in order to trace strategies for management of impacted populations.

Testando a influência de Barragens Hidroelétricas sobre a estruturação genética de estoques de *Prochilodus* spp (Characiformes, Prochilodontidae) em duas bacias hidrográficas bacia do Rio Tocantins e Bacia do Rio São Francisco.

Palavras Chave: *Prochilodus*, Genética de Populações, PCR, AMOVA, SkylinePlot.

INTRODUÇÃO

Os avanços sócio-econômicos e industriais pelos quais o Brasil passou na última década geraram uma crescente preocupação com a preservação dos recursos ambientais dentro de diversos setores da sociedade. O maior desafio no futuro é fazer com que este crescimento se dê de forma sustentável e que envolva o mínimo possível de degradação ambiental. Nos últimos anos de governo federal foi desenvolvido o PAC - Programa de Aceleração do Crescimento que previu investimentos maciços em projetos de infra-estrutura entre 2007 e 2010. Só para área energética o total estimado foi de R\$ 274,8 bilhões (<http://www.brasil.gov.br/pac/investimentos/>). Aliado a esse crescimento econômico está o desenvolvimento industrial que têm aumentado consideravelmente a demanda de água e energia nas grandes cidades brasileiras (Tucci et al. 2001). Aproximadamente 75% da energia produzida no país são de origem Hidrelétrica (ANEEL), isso é devido principalmente ao alto potencial hidrelétrico dos rios do país. Até 2008, existiam 829 usinas hidrelétricas instaladas gerando mais de 77.000MW, 87 em fase de construção, além de aproximadamente 228 projetos de usinas já outorgados (ANEEL 2010). Segundo o PAC, a região com o maior número de novas usinas hidrelétricas previstas é a região norte do país. Essa região é mundialmente conhecida como portadora de um dos maiores recursos hidrológicos do mundo e detêm, também, grande potencial hidroenergético. As bacias hidrográficas planejadas para a construção são as dos rios Tapajós, Aripuanã, Trombetas, Juruena,

Araguaia, Sucunduri, Branco, Jari, Itacaiunas, Jatapu, Madeira e Xingú (<http://www.brasil.gov.br/pac/investimentos/>).

Embora obras de infra-estrutura como as usinas hidrelétricas sejam realmente importantes para o desenvolvimento econômico, os impactos ambientais que a instalação das barragens associadas a estes empreendimentos são bastante severos. O efeito primário observado nos locais onde são construídas represas é o declínio das populações de peixes, causado por uma mudança no ambiente de lótico para lêntico (Neraas e Spruell. 2001). Essa mudança elimina ambientes naturais do rio, tais como corredeiras e córregos, os quais são utilizados por muitas espécies migratórias como locais de desova, podendo causar sérios impactos a estas espécies (Baumgartner et al. 2004, Clarke et al. 2007, Yan et al. 2008). Além disso, podem influenciar o padrão de migração de diversas espécies uma vez que agem como uma barreira física (Gosset et al. 2006). Essas barreiras causam fragmentação, poluição e degradação de habitats aquáticos, acarretando, em alguns casos, na perda de populações inteiras de peixes (Hedrick e Miller 1992; Godinho e Godinho, 1994; Northcote 1995; Meldgaard et al. 2003,), além de promover a alteração da composição da fauna (Loureiro-Crippa e Hahn 2006), bem como alterar a riqueza de espécies, diversidade e equitabilidade dos sistemas (Mol et al. 2007). Estas mudanças na qualidade da água causam alterações na disponibilidade de recursos alimentares das espécies residentes mudando a composição da dieta, podendo promover uma extensa alteração na cadeia trófica (Albrecht e Pellegrini-Caramaschi 2003; Godinho e Godinho 2003; Mérona et al. 2003; Loureiro-Crippa e Hahn 2006).

Existem alguns estudos na literatura que objetivaram a geração de informações sobre o impacto genético da fragmentação populacional em populações de peixes (Neraas e Spruell, 2001; Meldgaard et al. 2003; Laroche e Durand, 2004; Nguyen et al. 2006 e Nguyen 2008). A estruturação genética encontrada nos isolados populacionais estaria ligada à

interrupção do fluxo genético, deriva genética resultantes do isolamento. Mas também sob a influência de fatores históricos como alterações temporais no nível do mar, extinções locais e gargalos populacionais. A fragmentação de populações pode causar um aumento na deriva genética que eventualmente gera uma alteração da frequência e perda de alelos na população, (Hedrick e Miller, 1992). A redução na heterozigosidade conseqüentemente aumenta a exposição de alelos recessivos deletérios (Frankham et al. 2004). Estes fatores podem afetar de forma drástica uma população, principalmente aquelas de tamanho reduzido nas quais esses efeitos são sentidos mais rápida e severamente. Nestes casos, ocorre a diminuição da adaptabilidade e redução do potencial evolutivo. Em particular, a fragmentação da distribuição de populações de peixes causada por barragens pode levar ao declínio de populações locais em poucas gerações (Jager et al. 2001, Neraas e Spruell 2001, Fagan et al. 2002, Morita e Yokota 2002, Fagan et al. 2005). Para sobreviver, as populações de seres vivos precisam adaptar-se a essas mudanças repentinas.

No Brasil, o estudo de Lopes et al. (2007) com *Salminus brasiliensis*, utilizando RAPD, não encontrou diferenciação genética em suas populações a montante e a jusante das barragens de Canoas I e Canoas II, que possuem escadas para peixes conectando as populações. Carvalho-Costa et al. (2008) encontraram o mesmo padrão para populações de *Prochilodus costatus* na região da represa de Três Marias no rio São Francisco utilizando marcadores microssatélites. Entretanto um estudo utilizando RAPD foi feito na mesma região para avaliar a estruturação de populações de *P. argenteus*, e as populações estudadas manifestaram estruturação (Hatanaka et al. 2006).

Apesar desses esforços o conhecimento produzido ainda é escasso, principalmente no hemisfério Sul. Dessa forma, mais estudos objetivando noções substanciais a este respeito se fazem necessários. Tendo isso em vista foram escolhidos dois rios pertencentes a duas

grandes bacias hidrográficas brasileiras, Os rios São Francisco e Tocantins para a realização deste estudo.

O Rio São Francisco é um rio de planalto e sua bacia corre em sentido sul/norte e tem limite ao sul com a Serra da Canastra e Serra das Vertentes. A oeste tem como limite a Serra da Mata da Corda e dos altos Chapadões Goianos, enquanto a leste a serra do Espinhaço que constitui a espinha dorsal que liga as serras do Quadrilátero e da Chapada Diamantina, estendendo-se até o norte da Bahia (Godinho e Godinho, 2003).

Dos aproximadamente 3.000.000 ha de reservatórios instalados no Brasil, perto de 23% estão localizados no rio São Francisco. As seis maiores usinas hidrelétricas da bacia estão em seu curso principal. São elas: Três Marias, Sobradinho, Itaparica, Moxotó, Complexo Paulo Afonso e Xingó. Apenas a primeira se encontra no primeiro terço do rio, enquanto as demais estão localizadas em seu terço final. Estas usinas hidrelétricas possuem capacidade instalada de 7.902 MW e inundaram uma área de aproximadamente 6.250 km². Somente a represa de Sobradinho é responsável por uma área de 4.214 km² (Godinho e Godinho, 2003). Existem ainda mais seis usinas construídas em seus tributários (Carolsfeld, et al. 2004). Alguns desses represamentos têm mais de trinta anos e causaram uma grande redução no contato entre as populações de peixes residentes na bacia, principalmente os peixes migratórios.

Na região de Pirapora, a pesca no São Francisco caiu de 11,3 kg pescador/dia para aproximadamente 3 kg pescador/dia, entre 1997 e 1999. Algumas das espécies de interesse comercial no Rio foram declaradas como possivelmente ameaçadas após o declínio da pesca no alto São Francisco a jusante da barragem de Três Marias (Godinho e Godinho, 2003)

A bacia dos rios Tocantins-Araguaia é responsável pela drenagem de aproximadamente 11% do território brasileiro. É a segunda maior bacia localizada neste território e se estende por aproximadamente 967.000 km² envolvendo os estados de Goiás,

Mato Grosso, Tocantins, Maranhão, Pará e o Distrito Federal (ANA, 2009). A bacia do Tocantins-Araguaia apresenta uma vazão média de 13.799 m³/s (7,7% do total do país) e é a segunda do país, ficando atrás apenas da bacia Amazônica (ANA 2009). A nascente do rio Tocantins está situada no Planalto de Goiás (a cerca de 1.000 m de altitude), é considerado o 3º maior do país em extensão (com 2.640 Km). O rio Tocantins apresenta uma particular fisiografia que contribui para tornar a UHE de Tucuruí a maior usina por capacidade instalada totalmente no país e uma das cinco maiores do mundo, produzindo 8370 MW (ANA, 2009).

Após a construção da barragem de Tucuruí, profundas alterações foram observadas na ictiofauna e na pesca local. De acordo com Santos e Mérona (1996), populações de peixes a jusante dessa barragem desapareceram, acontecendo o mesmo com as espécies migradoras dentro do reservatório. Concomitantemente, populações de outras espécies sofreram explosões demográficas na área represada, e.g. piranhas, tucunarés e maparás.

A família Prochilodontidae (Characiformes) é composta por 21 espécies distribuídas em três gêneros, *Prochilodus*, *Semaprochilodus* e *Ichthyoelephas*, muitas das quais representam importante recursos pesqueiros (Castro e Vari, 2004; Moyer et al. 2005). As espécies que compõem o gênero *Prochilodus* são reconhecidamente especializadas em detritivoria, e possuem vagilidade dentro das bacias onde ocorrem (Yossa e Araújo-Lima, 1998, Sivasundar et al., 2001). Algumas espécies desse grupo chegam a representar 50 a 60% da biomassa em alguns rios (Taphorn, 1992). Elas ainda possuem excelente capacidade de adaptação a diferentes ambientes aquáticos, facilidade de fecundação artificial, manejo, regime alimentar, entre outros fatores (Maia et al. 1999). Essas características os tornam também alvo de atividades de cultivo em algumas regiões do Brasil. *Prochilodus* spp habitam ambientes lacustres e rios para reprodução, alimentação e dispersão, seguindo o

regime de sazonalidade dos rios das regiões em que habita e são classificadas como espécies migradoras (Castro e Vari, 2004).

Prochilodus argenteus, Agassiz 1829 é endêmico do Rio São Francisco (Castro e Vari, 2004), sendo uma das espécies mais importantes para a pesca nesta bacia (Hatanaka e Galetti Jr, 2004). *Prochilodus nigricans* Agassiz, 1829 é encontrada na região centro norte do Brasil, nas bacias do Amazonas e Tocantins, bem como no noroeste da América do Sul (Castro e Vari, 2004). Esta espécie está dentre as espécies de caracídeos mais importantes da várzea Amazônica. (Mota e Rufino, 1997).

Esses peixes são conhecidos por sua natureza migratória que acarreta em extensa distribuição geográfica espacial. O reflexo disso, é que, das 21 espécies da família 13 pertencem ao gênero *Prochilodus* (Turner et al. 2004). Sua distribuição se dá por quase todas as bacias hidrográficas da América do Sul e consiste em um elemento dominante na estrutura de suas comunidades e tem importância crucial da conservação dos ecossistemas onde são encontrados (Hatanaka e Galetti Jr, 2004). Por serem migratórios e possuírem extrema vagilidade intrabacia, é possível supor que as diversas populações ao longo de uma bacia hidrográfica estejam naturalmente em panmixia (Sivasundar et al., 2001).

Espécies de *Prochilodus* foram escolhidas neste estudo por serem migradoras, o que em teoria favorece o fluxo genético entre suas populações. O objetivo principal do estudo foi avaliar se as barragens causaram diferenciação genética entre os fragmentos populacionais de *P. argenteus* e *P. nigricans* nos rios São Francisco e Tocantins. Para isso foi calculada a variabilidade genética e estimado o fluxo genético dentro e entre as duas populações de *Prochilodus* coletados em nove pontos do curso do Rio São Francisco, e a montante e a jusante da Hidrelétrica de Tucuruí no rio Tocantins. O marcador molecular utilizado foi a região controladora do DNA mitocondrial (D-loop).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material

São Francisco

O material biológico necessário para a realização do trabalho foi coletado na bacia do São Francisco entre abril de 2007 e outubro de 2008, com a ajuda de colaboradores. As amostras, em sua maioria arcos branquiais e nadadeiras, foram preservadas em tampão DMSO/EDTA (Seutin et al. 1991). As quatro regiões da bacia do São Francisco, alto, central, sub-central e baixo São Francisco (Carolsfeld et al. 2004), foram subdivididas em 9 trechos (Figura 1) dos quais obtivemos 20 indivíduos por trecho. Buscou-se contemplar regiões sempre à montante e à jusante das principais barragens ao longo do curso do Rio São Francisco (Tabela I) para que o efeito da presença das mesmas na estruturação das populações de *Prochilodus argenteus* estudadas pudesse ser melhor avaliado. Os trechos amostrados foram os seguintes: 1. Montante de Três Marias (no lago de Três Marias – MG); 2. Jusante de Três Marias (entre as cidades de Três Marias e Januária – MG); 3. Montante de Sobradinho (na região de Bom Jesus da Lapa – BA); 4. Lago de Sobradinho; 5. Jusante de Sobradinho (entre as cidades de Juazeiro - BA e Petrolina - PE); 6. Montante de Itaparica (no lago da represa de Itaparica); 7. Jusante de Itaparica (entre as hidroelétricas de Itaparica e Paulo Afonso); 8. Montante de Xingó (entre as hidrelétricas de Paulo Afonso e Xingó); e 9. Jusante de Xingó (entre Xingó e a foz do rio) (Tabela II). No total foram obtidas 130 amostras no Rio São Francisco.

Tocantins

A coleta dos espécimes foi realizada a montante e a jusante da UHE de Tucuruí (Figura 2). As amostragens iniciais foram feitas com o auxílio de pescadores locais em duas

regiões a montante da UHE de Tucuruí: Pucurizinho e Funai. Posteriormente foram realizadas coletas em uma localidade a jusante da UHE de Tucuruí: Bacuri (próximo ao município de Baião). Grande parte das amostras foi adquirida em mercados locais (Mercados Municipais de Tucuruí e de Baião), animais com procedência conhecida. Os espécimes foram devidamente processados no Laboratório de ictiologia do Centro de Proteção Ambiental da Eletronorte (CPA) (Tabela III). As amostras, em sua maioria arcos branquiais e nadadeiras, foram preservadas em tampão DMSO/EDTA (Seutin et al. 1991),.

Procedimento Molecular

A Extração do DNA total das amostras foi efetuada utilizando-se o robô iPrep™ (Invitrogen™), com o uso do iPrep™ ChargeSwitchR gDNA Tissue Kit, conforme orientações do fabricante (Invitrogen™). A região do DNA mitocondrial escolhida para realização do estudo foi o D-Loop, ou região controladora, que varia entre cinco e dez vezes mais rapidamente que o DNA nuclear (Brown et al. 1979). Esta região foi amplificada com o auxílio dos primers xira F1 e xira R1 (Tabela IV), desenvolvidos no laboratório especificamente para espécies de *Prochilodus*, em reações em cadeia da Polimerase (PCR) (Mullis e Faloona, 1987). Esses fragmentos possuem aproximadamente 400 pares de base. As PCR foram feitas em termocicladores Eppendorf™ (Personal Thermocycler). As reações foram feitas para um volume final de 25 µl onde as concentrações finais dos reagentes foram ajustadas para 2 µM de cada primer, 0,4 mM de dNTP, 3 mM de MgCl, 2,5 U de Taq polimerase, tampão (buffer) 1x, e aproximadamente 2 ng/µl de DNA. A Reação foi feita com 35 ciclos. Cada ciclo teve as seguintes temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente: 94°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos. Na desnaturação inicial (Primeiro ciclo) foi mantida a temperatura de 95°C por 4 minutos e na extensão final (ultimo ciclo), utilizou-se a temperatura de 72°C por 5 minutos.

Uma fração do produto da PCR foi depositada em gel de eletroforese e visualizada, com o auxílio de coloração em brometo de etídio, em câmara com luz ultravioleta (Vilber Lourmat®) para confirmação da amplificação do fragmento desejado. Amplicons foram purificados com o Kit Montage – Life science kits (Millipore™) e utilizados para o seqüenciamento das duas fitas do fragmento desejado com o kit Big Dye v3 (Applied Biosystems®). As amostras resultantes foram seqüenciadas em um seqüenciador ABI3130. Todas as sequências foram editadas no programa STADEN (Staden, 2006).

Identificação molecular

A identificação morfológica dos indivíduos coletados no rio São Francisco evidenciou a ocorrência de duas espécies de *Prochilodus*, *P. costatus* Valenciennes, 1850 e *P. argenteus* Agassiz 1829. Sendo assim, a determinação específica dessas linhagens foi realizada utilizando o fragmento da Citocromo oxidase I (COI). As reações foram feitas para um volume final de 25 µl onde as concentrações finais dos reagentes foram ajustadas para 2 µM de cada primer, 0,4 mM de dNTP, 3 mM de MgCl, 2,5 U de Taq polimerase, tampão (buffer) 1x, e aproximadamente 2 ng/µl de DNA. A Reação foi feita com 35 ciclos. Cada ciclo teve as seguintes temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente: 94°C por 45 segundos, 66°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos. Na desnaturação inicial (Primeiro ciclo) foi mantida a temperatura de 95°C por 4 minutos e na extensão final (ultimo ciclo), utilizou-se a temperatura de 72°C por 5 minutos. Isso foi feito para evitar a má interpretação dos dados populacionais obtidos com as sequências de D-Loop. Essa identificação baseou-se na reconstrução do relacionamento filogenético dos indivíduos amostrados, como sugerido pela metodologia de códigos de barra de DNA (Hebert et al.2003). Todas as sequências obtidas foram alinhadas manualmente ou com auxílio do programa Clustal W (Thompson et al. 1994). As regiões com alinhamento

ambíguo foram omitidas das análises. A árvore filogenética que orientou a determinação específica dos espécimens foi obtida através do método de máxima verossimilhança, utilizando o programa Paup* (Swofford 2000) através do portal online Cipres (<http://www.phylo.org/portal/Home.do>). O modelo de evolução utilizado foi calculado utilizando o Mrmodeltest (Posada e Crandal, 1998) e o escolhido foi o HKY+I+G.

Genética Populacional

As sequências obtidas foram alinhadas no programa Clustal W versão 1.4 (Thompson et al., 1994) e conferidas visualmente no programa Bioedit versão 7.0.5.2 (Hall 1999). A Análise de Variância Molecular (AMOVA), a estatística F e a análise das diferenças pareadas - *Mismatch distribution* (Slatkin e Hudson 1991; Rogers e Harpending 1992) - foram realizadas com o auxílio do programa Arlequin (Excoffier et al. 2005). A quantificação dos haplótipos foi feita por contagem direta e a diversidade dos nucleotídeos foi calculada como sendo a probabilidade de que dois nucleotídeos homólogos selecionados ao acaso sejam diferentes entre si (Tajima 1983, Nei 1987). A quantidade de dados faltantes por sítio permitida foi de 0,05. A diversidade das populações estudadas foi analisada separadamente para cada população e com todas as populações agrupadas. Inserções e deleções foram consideradas com pesos idênticos.

Uma rede de haplótipos foi construída, com o auxílio do programa TCS versão 1.21 (Clement et al. 2000), para visualizar o relacionamento destes, bem como o modo pelo qual estes haplótipos estão distribuídos entre as populações. O programa utiliza análises estatísticas fundamentados pelo critério de parcimônia para estimar as genealogias de DNA (95%).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada para testar a existência de estruturação genética dentro e entre as populações analisadas. A matriz de distância foi

calculada através do método de distância pareada entre haplótipos (“pairwise difference”) com o número de permutações igual a 10.000. O índice de fixação (F_{ST}) foi calculado como sendo análogo ao θ_w , e sua significância foi calculada também através de 10.000 permutações.

A análise da distribuição de diferenças pareadas busca reconstruir o passado demográfico das populações estudadas. Esta análise é baseada na distribuição de frequência do número de diferenças observadas quando todos os haplótipos são pareados. A distribuição destas diferenças apresenta padrões gráficos relacionados a diferentes passados demográficos. Populações originadas recentemente (efeito fundador) ou que sofreram um gargalo populacional severo tendem a ter uma distribuição próxima à zero. Isso porque poucos haplótipos mantêm-se após tais efeitos (Frankham et al. 2004) estes por sua vez, quando pareados, exibem poucas diferenças entre si numa população recentemente formada. Distribuições bi-modais são relacionadas a populações que anteriormente não estavam desconectadas ou a gargalos populacionais menos severos com baixa redução de diversidade (Frankham et al. 2004). Distribuições que apresentam caráter unimodal representam populações que estão crescendo em ritmo exponencial (Frankham et al. 2004).

Três parâmetros são estimados à partir das curvas de *mismatch*, θ_0 , θ_1 e τ . Estes parâmetros são dados pelas equações: $\theta_0 = 2N_0u$, $\theta_1 = 2N_1u$, e $\tau = 2ut$, t representa o número de gerações que uma população inicial de tamanho efetivo N_0 vem a ter um tamanho N_1 , e u é a taxa de mutação estimada para todo o haplótipo. A curva que representa a distribuição das diferenças entre os haplótipos é deslocada para a direita à partir do momento em que o número de gerações aumenta. O extremo da curva é definido pelo τ , ou seja, se a curva se desloca a uma taxa $2u$, então o extremo estará a $\tau = 2ut$ depois de t gerações. Sendo assim, quanto mais próxima a curva estiver do eixo Y, mais recente será a população e quanto mais afastada, mais gerações t deverão ter se passado.

Os testes de neutralidade de Tajima D (1989) e Fu Fs (1997) buscam testar o equilíbrio entre a perda de alelos por deriva e a entrada de novos alelos por mutação em uma população. Estes testes são baseados no modelo de sítios infinitos (“infinite-site model”) e implicam em não recombinação, são usados largamente para análises populacionais que envolvam seqüências de pequenos fragmentos de DNA. O teste de Tajima compara duas estimativas independentes do parâmetro de mutação θ . A primeira estimativa é obtida através do número de sítios polimórficos e a segunda, a partir da média das diferenças entre os nucleotídeos quando comparadas as seqüências. Já o Fs de Fu compara o número observado de alelos com o número de alelos esperados se a população se mantivesse constante. O Fs tende a ser negativo quando existe um acúmulo de mutações recentes.

Com o auxílio do alinhamento de seqüências de D-loop das espécies de *Prochilodus lineatus* (bacia do Paraná); *P. argenteus* e *P. costatus* (Bacia do São Francisco); e *P. nigricans* (bacia do Tocantins) realizou-se uma análise filogenética com o Programa BEAST (Drummond e Rambaut, 2007) baseado em Bayesiana MCMC (Markov Chain Monte-Carlo) para a análise de seqüências moleculares. Essa análise filogenética mostrou o relacionamento entre um grupo formado pelas espécies *P. argenteus* do São Francisco e *P. lineatus* do Paraná e outro grupo formado pelas espécies de *P. costatus* do São Francisco e *P. nigricans* do Tocantins (Figura 3). A partir disso foi calculado o relógio molecular mais adequado para a evolução molecular do D-Loop de *Prochilodus*, calibrado a partir de um evento de conexão entre as bacias do Paraná e São Francisco (Montoya-Burgos, 2003), datada entre 5,7 e 6,4ma utilizando protocolo de análise do pacote BEAST (Drummond e Rambaut, 2007).

Para a análise de crescimento populacional foi utilizada a teoria de coalescencia, que busca traçar a partir dos dados haplotípicos atuais uma genealogia que leve ao ancestral comum mais recente (MRCA- *Most recent comon ancestor*), revelando assim a história evolutiva das populações analisadas registrando eventos de retração e expansão

populacionais ao longo do tempo. Para a confecção dos gráficos *Bayesian Skyline* foi utilizado o programa TRACER. Os *Skyline Plots* gerados pelo programa são representações gráficas da variação temporal das populações estudadas. A análise foi repetida seis vezes com todas apresentando o mesmo padrão de resultado. O comprimento de cadeia utilizado foi de 30.000.000. O modelo foi calculado utilizando o Mrmodeltest (Posada e Crandal, 1998) e o escolhido foi o HKY+I+G.

RESULTADOS

São Francisco

O alinhamento dos fragmentos de COI gerou dois grupos distintos de sequências que demonstraram conter mais semelhanças entre si do que entre elas. Comparando as duas árvores filogenéticas geradas pelo D-Loop (metodologia geral do estudo) e o COI, o grupo de sequências divergentes que resultava na retirada do menor número de indivíduos amostrados foi excluído das análises. Esse grupo corresponde aos indivíduos identificados como *P. costatus*. Assim, as análises populacionais subsequentes foram realizadas apenas com os indivíduos determinados como sendo de *P. argenteus*.

A região do DNA mitocondrial D-Loop foi amplificada de um total de 113 indivíduos de *P. argenteus*. Os fragmentos foram editados, cortando-se os mais longos, para formar uma matriz de dados homogênea que resultou em 130 fragmentos portando 391 nucleotídeos.

O alinhamento das sequências de D-loop de *P. argenteus* analisadas demonstrou a presença de 96 sítios polimórficos, 109 substituições (sendo 91 transições e 18 transversões) e 2 “indels”. A diversidade de nucleotídeos encontrada para todas as seqüências agrupadas foi de 2,5% (Tabela V). A diversidade de nucleotídeos dentro das subpopulações variou entre 1,8% e 2,7%. Nos pontos 5 e 7 apenas um e dois indivíduos respectivamente foram capturados, e apenas um haplótipo por localidade foi detectado (0% de diversidade). A frequência relativa de nucleotídeos estimada foi C: 20,17%, T: 32,77%, A: 38,16%, G: 8.9%. A análise dos fragmentos de DNA revelou a existência de 92 haplótipos diferentes entre os 9 locais de coleta, com o número de haplótipo por localidade variando entre 1 e 20 haplótipos. Analisando cada ponto verificamos entre 19 e 50 sítios polimórficos entre os haplótipos quando comparados

Visualizando a rede de haplótipos (Figura 4), pode-se perceber a ausência de dominância de um haplótipo sobre os demais. As frequências relativas dos haplótipos quando agrupadas as subpopulação são bastante baixas, entre 0,0088 e 0,035, pois poucos dos 90 haplótipos apareceram mais de uma vez dentre os trechos amostrados, nunca superando quatro repetições. Mesmo haplótipos coletados em regiões separadas por mais de 1.500 quilômetros formaram agrupamentos proximamente relacionados.

O F_{ST} estimado para a população de *P. argenteus* foi de 0,00413 ($p=0,62574\pm 0,00492$), um valor que sugere um alto fluxo gênico entre as subpopulações e ausência de estruturação. Os resultados da AMOVA ($p=0,42059\pm 0,00488$) demonstraram que existe consideravelmente mais variação dentro das subpopulações do que entre elas com percentagens de 100,41% e -0,41%, respectivamente (Tabela VI).

A análise distribuição das diferenças pareadas mostrou um padrão unimodal, com a curva em formato de sino (Figura 5) sugerindo *P. argenteus* no rio São Francisco encontra-se em expansão populacional. Os valores de D (-1,625; $p=0,022$) e F_s (-24,541; $p=0,000$) foram negativos para todas as populações locais de *P. argenteus* agrupadas e reforça a existência de recente expansão populacional em *P. argenteus* (Tabela VII). Baseado na taxa de mutação para o D-loop para *Prochilodus* calculada nesse estudo (0,0073 mudanças/sítio/ma), os resultados da reconstrução Bayesiana da história demográfica por Skyline (Figura 6) corroboram com a conclusão das análises de distribuição das diferenças pareadas as quais sugerem que a população do São Francisco encontra-se em expansão populacional constante nos últimos 1,75 ma, com um ligeiro aumento nos últimos 250.000 anos.

Tocantins

Ao todo, 100 espécimes de *P. nigricans* foram analisados, sendo 50 de cada trecho amostral. O produto do sequenciamento resultou em 396 pares de base da região D-loop.

Notavelmente, um dos indivíduos coletados a montante da UHE de Tucuruí apresentou um evento de inserção de 106 pares de base compostos por sequências repetidas em tandem, gerando um fragmento com 506 pares de base.

No total, 50 haplótipos foram revelados pelo alinhamento, divididos entre os pontos amostrados. Os haplótipos são resultantes de 61 loci polimórficos com 64 substituições, sendo 44 transições e 20 transversões. Todos os loci foram utilizados na análise; nenhum teve mais de 0,05 de dados faltantes (“missing data”). A frequência estimada da composição de nucleotídeos foi: A = 32,37%; T = 39,02%; e G = 20,17%; C = 8,47%. A variabilidade genética entre as sequências foi relativamente alta e a diversidade nucleotídica de todas as sequências foi de 1,33% (Tabela VIII). Os espécimes coletados a montante da UHE de Tucuruí apresentaram no total 32 haplótipos, enquanto os representantes a jusante apresentaram 29, sendo que destes, 11 foram compartilhados entre as duas regiões.

A rede de haplótipos (Figura 7) construída para *P. nigricans* evidencia uma ausência de dominância na relação inter-haplotípica. Apesar disso, é possível reconhecer a presença de alguns haplótipos que apresentaram maior frequência. Entretanto, o fragmento mais frequente não superou 12,5% (12 indivíduos), o segundo mais frequente representou 9,3% (9 indivíduos) e o terceiro 8,3% (8 indivíduos). Os demais fragmentos não chegaram a 4% nas populações, entre 1 e 3 indivíduos amostrados. Estes três haplótipos estão presentes nos dois trechos de coleta (Figura 7). A ausência de uma linhagem genealógica de haplótipos exclusiva de um trecho ou de um conjunto de trechos amostrados são indícios de que existe homogeneidade entre as populações analisadas.

A análise de estatística F apontou a ausência de estruturação entre as populações ($F_{ST} = 0,00115$). Enquanto que os resultados da AMOVA (Tabela IX) mostraram a existência de maior variância dentro das populações do que entre as mesmas ($p = 0,482 \pm 0,00439$), corroborando assim, a grande homogeneidade.

A análise de distribuição das diferenças pareadas resultou em um padrão de distribuição formado por uma curva levemente bimodal (Figura 8) com uma média das diferenças pareadas de 5,28 e 10 nucleotídeos. A maior frequência de pareamentos com baixa variação entre os indivíduos mostra uma população em expansão recente. Ao mesmo tempo em que o aparecimento de uma segunda moda, sugere o contato de populações anteriormente separadas.

Os valores negativos dos testes de neutralidade D (-1,773; $p=0,012$) e F_s (-24,831; $p=0,000$) (Tabela X) corroboram a idéia de expansão populacional recente das populações de *P. nigricans* analisadas (Fu 1997, Tajima 1989). *Prochilodus nigricans* é uma espécie reconhecidamente migradora (Castro e Vari, 2004), o que favorece a conexão e a homogeneidade entre as diferentes populações no curso de um rio (Sivasundar et al. 2001).

A reconstrução Bayesiana por Skyline das populações do Tocantins (Figura 9) tal como as populações de *P. argenteus* do São Francisco, corroboram com a conclusão das análises de distribuição das diferenças pareadas que mostram um padrão de expansão populacional recente. No Tocantins, foi detectada uma expansão populacional mais antiga, que ocorreu há aproximadamente 750 mil anos e a expansão recente, num período semelhante àquele de *P. argenteus*, é ligeiramente mais abrupta.

DISCUSSÃO

Análises moleculares

A alta variabilidade genética encontrada em ambas as espécies estudadas nos Rios São Francisco e Tocantins é esperada para a região controladora do DNA mitocondrial, tanto quando levamos em conta o número de haplótipos, quanto à diversidade nucleotídica (Bremer et al. 1997, Rocha-Oliveira et al. 2000, Sivasundar et al. 2001, Martins et al. 2003). Essa diversidade está intimamente ligada à alta taxa de mutação apresentada pelo D-loop quando comparado a outras regiões do DNA mitocondrial e mesmo ao DNA nuclear. Esta característica reflete o fato de que a região em questão não é codificadora, mantendo uma função estrutural, que favorece ao acúmulo de mutações neutras beneficiando amplamente estudos de genética populacional. (Zhang et al. 2003; Mcphee et al. 2008; Yan et al. 2008; Nazia et al. 2010). Entretanto o fragmento é igualmente utilizado para reconstruções filogenéticas de grupos mais apicais, como de membros de *Sinodontis* e *Thunnus* (Bremer et al. 1997; Koblmuller et al. 2006).

Apesar de raro nas amostras do presente estudo, heteroplasmia por *indel* é um evento relativamente comum em peixes. Trata-se de uma heteroplasmia por diferença de tamanho, *i.e.* um polimorfismo intraespecífico e intraindividual que frequentemente ocorre em populações naturais (Fumagalli et al. 1996; Mundy et al. 1996). É considerada um estágio transitório para fixação de sequências alternadas ao longo de diferentes linhagens, sendo rara no caso de mutações pontuais (Brown et al. 1992). Assim como ocorre em *P. nigricans*, é mais frequentemente observada em estruturas repetidas em tandem localizadas na Região Controladora do DNA mitocondrial (D-loop) (Moritz et al. 1987; Rand 1993), podendo persistir por muitas gerações (Solignac et al. 1983; Harrison et al. 1985), uma vez que é capaz de formar estáveis *hairpin loops* (Rand e Harrison 1989; Buroker et al. 1990; Mignotte

et al. 1990; Wilkinson e Chapman 1991). Buroker et al. (1990) sugere que estas estruturas promovem uma alta taxa de mutações recorrentes, representando o processo fundamental para manutenção dessas heteroplasmias em face à tendência de rápida segregação para eliminá-las.

A ausência de diferenciação de populações a jusante e a montante das barragens não parecem associadas a uma hipotética inadequação do marcador (D-LOOP) a esse tipo de evento. Kawamura et al. (2006) puderam detectar para este fragmento eventos de deriva genética em populações de *Lepomis macrochirus* recentemente isoladas do pool genético original. Por outro lado, essa ausência de estruturação também não pode ser vista como evidência de ausência de impacto genético nas espécies estudadas associadas às barragens de hidrelétricas.

O fato de termos encontrado haplótipos iguais em trechos muito distantes uma da outra do rio São Francisco (trecho 1 e trecho 9), corrobora com o estudo de Sivasundar et al. (2001) que registrou padrão semelhante para *P. lineatus* na Bacia do Rio Paraná. Nesse estudo, indivíduos distantes 1.816 km possuíam o mesmo haplótipo. O autor relaciona esse padrão com o alto poder de deslocamento migratório em Prochilodontidae, capazes inclusive de superar corredeiras e quedas. Entretanto Godinho e Kynard (2006), propuseram que juvenis de *Prochilodus argenteus* já demonstraram capacidade de deslocamento sentido montante para reencontrar os parentais, após o deslocamento dos estágios larvais rio abaixo. Este padrão sugere que não descartemos a possibilidade de que a migração dos jovens possa agir na manutenção do fluxo genético populacional. Neste mesmo trabalho os autores sugerem que exista homing reprodutivo em *Prochilodus*, onde adultos de determinada população voltariam para os sítios reprodutivos desta população. Porém o modelo proposto por Godinho e Kynard sugere que exista sobreposição entre os sítios reprodutivos, o que sugere outra forma de conexão entre diferentes populações.

Inércia Genética

Mesmo que o resultado desse estudo (e de outros semelhantes) sugira conectividade continuada entre as subpopulações, não há escadas ou outro mecanismo de conexão entre as regiões a montante e a jusante das barragens no Rio São Francisco e em Tucuruí. Entretanto o resultado do presente estudo pode ser associado a uma qualidade que podemos denominar de *inércia genética* das populações. A ausência de sinal detectável de estruturação das populações de *Prochilodus spp.* nesses sistemas refletiria cenários (interação de parâmetros) que inibem ou retardam eventos de deriva genética. Isso se deveria às características da espécie (história, biologia, distribuição e comportamento), do sistema fluvial (área, estabilidade, uniformidade ambiental) e das características dos represamentos (idade, presença de sistemas de transposição). Entretanto não se deve descartar a possibilidade de que adultos ou juvenis esporadicamente sejam capazes de passar pelas turbinas nas barragens. Nesse caso um número freqüente de migrantes conectando as populações seria capaz de manter o fluxo genético entre os fragmentos populacionais, e suavizar os efeitos da fragmentação.

Por possuírem um tamanho populacional grande, bem como hábito migratório, é esperado que as populações de *Prochilodus* estudadas exibam uma alta diversidade genética e conseqüente elevado tamanho efetivo populacional, os quais diminuem o efeito da deriva genética e a perda dessa diversidade (Turner et al., 2004). De fato, os valores de Theta (Tabelas V e VIII) das populações nos dois casos estudados aqui parecem sugerir que as mesmas possuem tamanhos efetivos suficientes para retardar os efeitos deletérios da fragmentação associadas à construção de barreiras artificiais.

Analisando os diversos aspectos abordados nesse e nos outros estudos alguns fatores são proeminentes quando analisamos a fragmentação populacional. São eles: tamanho

populacional, tamanho do fragmento, tempo de geração da espécie e tempo em que as populações foram separadas. Nos estudos onde foi observada estruturação entre populações fragmentadas (Neraas e Spruell, 2001; Meldgaard et al. 2003; Laroche e Durand, 2004; Nguyen et al. 2006 e Nguyen 2008), os rios analisados são de pequeno porte, gerando fragmentos muito menores do que os observados nesse estudo e o estudo de Zhang et al. (2003) no rio Yangtze, onde não foi observada estruturação genética. Essa conclusão é especialmente significativa uma vez que a instalação de Pequenas Centrais Hidroelétricas (PCH's) está sendo incentivada em âmbito federal, estadual e municipal, em diversos rios de pequeno e médio porte no Brasil. PCH's são geralmente construídas em rios de menor tamanho e frequentemente muito próximas umas das outras, se aproveitando de acidentes geográficos locais, e acentuando o potencial efeito da fragmentação e alteração do fluxo gênico entre as populações resultantes a montante e jusante das barreiras.

Por outro lado não se pode esquecer o tempo em que determinado fragmento é gerado e de como o tempo de geração de uma espécie influi sobre a extensão do impacto na estrutura genética das populações. Zhang et al. (2003) sugerem que a ausência de estruturação genética nas populações de esturjão estudadas está ligada ao longo tempo de geração observado para espécie *Acipenser sinensis* (20 anos aproximadamente), e que o gargalo populacional causado pela fragmentação seria observado em 3 ou 4 gerações. Entretanto, para as populações de *Prochilodus* analisadas aqui, a mesma falta de estruturação foi detectada para espécies com tempo de geração sete vezes menor em fragmentos tão grandes quanto o analisado no Yangtze.

Sendo assim quando isolamos a variável tempo de implantação de uma barreira e a comparamos com o tempo de geração de uma espécie podemos supor que espécies com menor tempo de geração vão apresentar efeitos em sua estrutura genética mais rapidamente do que espécies com maior tempo de geração. É esperado também que ao isolarmos a

variável tempo de geração e analisarmos o tempo da barreira o mesmo padrão deve ser observado para barreiras mais antigas. Com base nos nisso e nos resultados apresentados neste trabalho é sugerido que o grau de alteração da estrutura genética de uma população deve ser maior quando menores forem os fragmentos resultantes da introdução de barreiras artificiais. E ainda, quanto maior o tempo de isolamento entre as populações estudadas e quanto menor seu tempo de geração mais sensível será o impacto na estrutura genética destas populações.

Jager et al. (2001) propõem um modelo para o esturjão (*Acipenser transmontanus*) no rio Snake, onde o impacto na estrutura genética pela fragmentação da população ficaria mais severo à medida em que se aumentam o número de fragmentos e se agravaria em situações onde houvesse perda do habitat natural com a formação do reservatório. Entretanto, em situações onde porções significativas do fragmento possuem as características necessárias para a manutenção da população o impacto é semelhante a situações onde existe isolamento sem a perda de qualidade do habitat. O que corrobora com dois estudos que avaliaram o impacto da introdução da barragem de Ghezouba no curso do rio Yangtze por aproximadamente 20 anos. O estudo de Zhang et al. (2003) com o esturjão (*Acipenser sinensis*), mostrou que o tamanho do trecho remanescente da fragmentação do rio foi suficiente para a manutenção da população. Yan et al. (2008) estudaram a possível alteração da estrutura genética de *Coreius heterodon* no mesmo rio. O resultado encontrado foi de que, apesar da queda dos números populacionais, devido à alteração de áreas de reprodução e do número de presas, a estrutura genética das populações a montante e a jusante foi a mesma. Além disso, Zhang et al. (2003) indicam que a análise da genética populacional do esturjão demonstrou maiores diferenças dentro das populações do que entre populações, tal como o nosso estudo.

Porém, o resultado mais relevante do modelo proposto por Jager et al. (2001) para elaboração de estratégias de conservação de espécies, foi a importância do balanço entre a migração montante/jusante entre os isolados populacionais. A assimetria entre os dois tipos de migração gera perda de heterozigosidade nas populações entre as barreiras artificiais, por causa da diminuição do tamanho populacional e a perda de diversidade subsequente a essa diminuição que agravam a possibilidade de impactos mais severos nas populações de cabeceira quando a migração para jusante supera a migração a montante (Jager et al. 2001).

No caso do rio São Francisco as barragens mais antigas produziram fragmentos com grandes extensões compreendendo populações de *P. argenteus* de tamanho proporcional. Enquanto as barragens mais recentes produziram fragmentos de menor tamanho, em especial na região do médio e baixo São Francisco (vide Figura 1). No primeiro caso, as populações resultantes teriam sido suficientemente grandes de maneira a conter ou adiar o estabelecimento de alterações de frequência de haplótipos nas populações estudadas decorrentes de deriva genética e os fragmentos resultantes seriam suficientemente semelhantes ao curso natural do rio, reduzindo a possibilidade de diferenciação local por seleção. Corroborando as proposições de Jager e colaboradores (2001). No segundo caso, a formação de populações fragmentadas de menor tamanho não resultou em diferenciação local provavelmente devido ao fato de que essas populações foram fragmentadas apenas recentemente (i.e. em termos de tempos de geração da espécie de peixe em questão).

De fato, o estudo de Kawamura et al. (2006) e de outros pesquisadores parecem suportar a importância dos parâmetros discutidos acima na previsão dos impactos genéticos de populações de peixes fragmentadas pela construção de barragens em sistema fluviais. Hipoteticamente, o equilíbrio entre tamanho do fragmento, o tamanho populacional resultante o tempo de existência do barramento são fatores importantes na determinação da estrutura da população de peixes afetada (*inércia genética*).

As populações de *P. argenteus* no Rio São Francisco e *P. nigricans* no Rio Tocantins foram estudadas em diferentes escalas. Nove pontos ao longo de todo o curso do São Francisco, e apenas dois pontos no Rio Tocantins. Mesmo com essa diferença os mesmos padrões de alta diversidade genética e distribuição haplotípica generalizada foram verificados nas duas bacias. Seus resultados corroboram estudos anteriores que sugerem que essa diversidade estaria ligada ao hábito migratório e a abundância de algumas espécies de peixes de água doce nos rios onde são encontrados (Ramella et al. 2006; Oliveira et al. 2009), entre elas as espécies de *Prochilodus*. Bay et al. (2004) sugerem que esse fenômeno seja reflexo de um grande fluxo genético atual e histórico entre diferentes populações no espaço. Mccusker e Bentzen (2010) encontraram altos valores de diversidade nucleotídica bem como haplotípica para o DNA mitocondrial em populações abundantes. Os resultados descritos nesse trabalho corroboram fortemente a relação entre a abundância de espécies de *Prochilodus* nas bacias onde são encontradas com os mesmos índices de diversidade observados para o conjunto de sequências do DNA mitocondrial estudadas.

Grandes Rios, tais como o São Francisco e o Tocantins, estão em constante mudança em seus cursos e bacias, que causam alterações em suas características abióticas e bióticas, para se acomodar a mudanças tanto climáticas como geológicas (Ribeiro, 2006). É impensável encarar os rios como tendo um começo e um fim bem definidos (Potter, 1997). A base geológica da bacia do Rio São Francisco, por exemplo, é o Cráton São Francisco. Crátons são porções estáveis dos continentes formadas por rochas do Cambriano (Ribeiro, 2006). Diversos processos orogênicos resultado das junções e quebras de supercontinentes ocorreram desde o Proterozóico gerando diversas bacias sedimentares e cinturões orogênicos como o da província do Tocantins (Ribeiro, 2006). É ilusório imaginar que toda a composição destes rios hoje seja igual a aquela de sua primeira formação geológica. Com

isso em vista, assumimos como Potter (1997) que a idade de um rio está ligada diretamente ao último evento tectônico ou glacial em sua bacia hidrográfica.

Temporalmente, entretanto, a população de *P. nigricans* do Tocantins sua última expansão num período mais recente do Pleistoceno quando comparada com a população de *P. argenteus* do São Francisco. A população de *P. argenteus* teve um crescimento populacional mais homogêneo ao longo dos últimos 1,75 milhões de anos com um leve desvio nos últimos 250.000. A população de *P. nigricans* teve dois pontos de crescimento populacional, um bastante acentuado à 750.000 anos e um mais recentemente 100.000 anos.

O Período Pleistoceno foi marcado por uma série de flutuações climatológicas que fragmentaram e re-conectaram diferentes habitats uma série de vezes. Durante este período espécies de diversos gêneros sofreram retrações e subseqüentes expansões populacionais, tais como mamíferos terrestres (*Bison*, *Cervus*, *Equus*; Burns, 2010); peixes (*Neosilurus* e *Porochilus*; Huey et al. 2006) e artrópodes (*Caridina* e *Metacnephia*; Hughes et al., 2009). Essas oscilações temporais fundamentaram inclusive a teoria de refúgios do Pleistoceno, que seriam responsáveis pela alta diversidade de espécies na região Neotropical (Montoya-Burgos, 1982). Embora exista muita controvérsia sobre o papel destes eventos sobre a especiação na América do Sul (Weitzman e Weitzman, 1982; Montoya-Burgos, 2003), mudanças no ambiente como o avanço e retração de geleiras podem causar impactos consideráveis na estrutura populacional de espécies com ampla distribuição (Burns, 2010). Estas alterações climáticas forçam populações a contrair sua área de vida em épocas de clima adverso e a expansão populacional subsequente à retração favorece a ocorrência de eventos de dispersão (Burns, 2010; Hänflin et al., 2010), e conseqüente reconexão entre os remanescentes populacionais isolados.

Para peixes marinhos, Bay et al. (2004) sugerem que a fragmentação e reconexão entre populações associadas a oscilações no nível do mar sejam responsáveis por altas taxas

de diversidade genética, acumulada durante os períodos de isolamento. A análise de distribuição das diferenças pareadas da população de *P. nigricans* sugere um contato secundário ao mesmo tempo em que sua coalescência mostra uma expansão populacional bastante acentuada no período entre os últimos 10 mil anos. Esses dois resultados podem sugerir uma reconexão após a regressão do último período de glaciação do Pleistoceno. Grant e Bowen (1998) em seu estudo com animais marinhos sugerem que altos índices de diversidade genética possam ser, além de indicativos de longevidade e estabilidade na história evolutiva, resultado de contato secundário entre populações separadas.

Implicações

Mesmo com a fragmentação artificial das populações de *P. argenteus* e *P. nigricans*, as subpopulações isoladas de peixes ainda se apresentam como uma população panmítica. É preciso ressaltar o importante fator histórico de que, apesar da aparente ausência de efeito das barragens instaladas no Rio São Francisco, este curso tem sofrido impactos ambientais severos nos últimos 60 anos. A Usina hidrelétrica de Paulo Afonso teve sua implantação nos anos 50, seguida pelos outros represamentos (Tabela I) e culminando com o atual processo de transposição de suas águas para outras bacias. Informações sobre a extensão do fluxo genético entre populações fragmentadas são críticas para determinar quando espécies necessitam de intervenção humana para prevenir efeitos deletérios causados por endocruzamento e perda de diversidade genética, que podem ocorrer em caso de tamanhos efetivos populacionais menores (Frankham et al. 2004).

Uma vez que o reflexo da estrutura genética populacional sugere conexão entre as populações de *P. nigricans* e *P. argenteus* nesse estudo e de *P. lineatus* (Sivasundar et al. 2001) podemos sugerir que esse é um caráter compartilhado pelo grupo e corroborado por suas características biológicas. Entretanto esforços para a manutenção da variabilidade

genética sempre valem a pena, uma vez que podem ser responsáveis pela possibilidade de uma população adaptar-se a impactos ambientais futuros (Zhang et al. 2003). Em casos como os das duas populações estudadas, é interessante que se concentrem em uma região determinada, preferencialmente de alta diversidade, para que se possa translocar indivíduos para colonizar áreas impactadas quando houver necessidade (Haig, 1998; Jager et al. 2001). No caso do rio São Francisco as regiões que mantiveram maiores índices de diversidade nucleotídica são as regiões a jusante de Três Marias e a montante de Sobradinho (Tabela V). Coincidentemente essa é a região com o maior trecho entre todos os fragmentos, e que manteria maiores áreas com as características naturais do curso do Rio, ideais para a conservação da diversidade genética da população de *P. argenteus* na bacia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht M, Pellegrini-Caramaschi E (2003) Feeding ecology of *Leporinus taeniofasciatus* (Characiformes: Anostomidae) before and after installation of a hydroelectric plant in the upper rio Tocantins, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **1**, 53-60.
- ANA - Agência Nacional de Águas (2009) *Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil*. Disponível em: http://conjuntura.ana.gov.br/conjuntura/rh_tocantins.htm
- ANEEL - Agencia Nacional de Energia Eletrica (2010) *Banco de Informações de Geração Capacidade de Geração do Brasil*. Disponível em <http://www.aneel.gov.br/>
- Baumgartner G, Nakatani K, Gomes LC (2004) Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, **71**, 115–125.
- Bay LK, Choat JH, van Herwerden L, Robertson DR (2004) High genetic diversities and complex genetic structure in an Indo-Pacific tropical reef fish (*Chlorurus sordidus*): evidence of an unstable evolutionary past? *Marine Biology*, **144**, 757–767.
- Bremer JRA, Naseri I, Ely B (1997) Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Fish Biology*, **50**, 540–554.
- Brown WM, George Jr. M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**, 1967-1971.
- Brown JR, Beckenbach AT, Smith MJ (1992) Mitochondrial length variation and heteroplasmy in populations of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genetics*, **132**, 221–228.
- Burns J (2010) Mammalian faunal dynamics in Late Pleistocene Alberta, Canada. *Quaternary International*, **217**, 37–42

- Buroker NE, Brown JR, Gilbert TA, O'hara PJ, Beckenbacwh T, Thomaansd K, Smith M J (1990) Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. *Genetics*, **124**, 157-163.
- Carolsfeld TF, Harvey B, Ross C, Baer A (2004) Migratory Fishes of South America. World Fisheries Trust/World Bank.
- Carvalho-Costa LF, Hatanaka T, Galleti Jr PM (2008) Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish of *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 377-380.
- Castro RMC, Vari R (2004) Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. *Smithsonian contributions to zoology*; 622. 200p, Washington, D.C.
- Clarke AD, Telmer KH, Shrimpton JM (2007) Habitat use and movement patterns for a fluvial species, the Arctic grayling, in a watershed impacted by a large reservoir: evidence from otolith microchemistry. *Journal of Applied Ecology*, **44**, 1156–1165.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657-1660.
- Drummond AJ e Rambaut A (2007) "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evolutionary Biology* **7**, 214
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. **1**, 47-50.
- Fagan WF, Unmack PJ, Burgess C, Minckley WL (2002) Rarity, fragmentation, and extinction risk in desert fishes. *Ecology*, **83**, 3250–3256.
- Fagan WF, Aumann C, Kennedy CM, Unmack PJ (2005) Rarity, fragmentation, and the scale dependence of extinction risk in desert fishes. *Ecology*, **86**, 34–41.

- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2004) *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press. 220 p.
- Fu YX (1997) Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Fumagalli L, Taberlet P, Favre L, Hausser J (1996). Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Molecular Biology and Evolution*, **13**: 31–46.
- Godinho HP, Godinho AL (1994) Fish communities in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *Acta Limnologica Brasileira*, **5**, 187-197.
- Godinho HP, Godinho AL (2003) Águas, Peixes e Pescadores do São Francisco das Minas Gerais. SOGRAFE – Editora e Gráfica Ltda. 461p.
- Godinho AL, Kynard B (2006) Migration and Spawning of Radio-Tagged Zulega *Prochilodus argenteus* in a Dammed Brazilian River. *Transactions of the American Fisheries Society*, **135**, 811–824.
- Gosset C, Rives J, Labonne J (2006) Effect of habitat fragmentation on spawning migration of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecology of Freshwater Fish*, **15**, 247–254.
- Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. *The Journal of Heredity*, **89**, 415-426.
- Haig SM (1998) Molecular Contributions to Conservation. *Ecology*, **79**, 413-425.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hänfling B, Dümpelmann C, Bogutskaya NG, Brandl R, Brändle M (2009) Shallow phylogeographic structuring of *Vimba vimba* across Europe suggests two distinct refugia during the last glaciations. *Journal of Fish Biology*. **75**, 2269–2286.

- Harrison RG, Rand DM, Wheeler WC, (1985) Mitochondrial DNA size variation within individual crickets. *Science* **228**, 1446-1448.
- Hatanaka T, Galletti Jr PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae) *Genetica*, **122**, 239–244.
- Hatanaka T, Henrique-Silva F, Galletti Jr PM (2006) Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*. **126**, 153-159.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identification through DNA barcode. *Proceedings Of the Royal Society Of London Serie B, Biological sciences*, **279**, 313-322.
- Hedrick PW, Miller PS (1992) Conservation genetics: Techniques and fundamentals. *Ecological Applications*. **2**, 30–46.
- Huey JA, Hughes JM, Baker AM (2006) Patterns of gene flow in two species of eel-tailed catfish, *Neosilurus hyrtlii* and *Porochilus argenteus* (Siluriformes: Plotosidae), in western Queensland's dryland rivers. *Biological Journal of the Linnean Society*, **87**, 457–467.
- Hughes JM, Schmidt DJ, Finn DS (2009) Genes in Streams: Using DNA to Understand the Movement of Freshwater Fauna and Their Riverine Habitat. *Bioscience*, **7**, 573-583.
- Jager HI, Chandler JA, Lepla KB, Winkle WV (2001) A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. *Environmental Biology of Fishes*, **60**, 347–361.
- Kawamura K, Yonekura R, Katano O, Taniguchis Y, Saitoh K (2006) Origin and dispersal of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea. *Molecular Ecology*, **15**, 613–621.

- Koblmüller S, Sturmbauer C, Verheyen E, Meyer A, Salzburger W (2006) Mitochondrial phylogeny and phylogeography of East African squeaker catfishes (Siluriformes: *Synodontis*). *Evolutionary Biology*, **6**, 49-65.
- Laroche J, Durand JD (2004) Genetic structure of fragmented populations of a threatened endemic percid of the Rhône river: *Zingel asper*. *Heredity*, **92**, 329–334.
- Lopes CM, Almeida FS, Orsi, ML, Britto, SGC, Sirol RN, Sodr e LMK (2007). Fish passage ladders from Canoas Complex-Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, **5**, 131-138.
- Loureiro-Crippa VE, Hahn NS (2006) Use of food resources by the fish fauna of a small reservoir (rio Jord o, Brazil) before and shortly after its filling. *Neotropical Ichthyology*, **4**, 357-362.
- Maia EL, Oliveira CCS, Santiago AP, Cunha FEA, Holanda FCAF, Sousa JA (1999) Chemical composition and lipids classes of the freshwater fish "curimat a comum", *Prochilodus cearensis*. *Ci ncia e Tecnologia de Alimentos. Campinas*. **19**.
- Mccusker MR, Bentzen P (2010) Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes. *Molecular Ecology*. **19**, 4852-4862.
- Mcphee MV, Osborne MJ, Turner TF (2008) Genetic Diversity, Population Structure, and Demographic History of the Rio Grande Sucker, *Catostomus (Pantosteus) plebeius*, in New Mexico. *Copeia*, **1**, 191–199.
- Meldgaard T, Nielsen EE, Loeschckel V (2003) Fragmentation by weirs in a riverine system: A study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. *Conservation Genetics*, **4**, 735–747.

- Mérona B, Vigouroux R, Horeau V (2003) Changes in food resources and their utilization by fish assemblages in a large tropical reservoir in South America (Petit-Saut Dam, French Guiana). *Acta Oecologica*, **24**, 147–156.
- Mignotte F, Gueridea M, Champagnaned M, Mounolou JC (1990) Direct repeats in the noncoding region of rabbit mitochondrial DNA: involvement in the generation of intraand inter-individual heterogeneity. *European Journal of Biochemistry*, **194**, 561-571.
- Mol JH, de Mérona B, Ouboter PE, Sahdew S (2007) The fish fauna of Brokopondo Reservoir, Suriname, during 40 years of impoundment. *Neotropical Ichthyology*, **5**, 351-368.
- Morita K, Yokota A (2002) Population viability of stream-resident salmonids after habitat fragmentation: a case study with white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) by an individual based model. *Ecological Modelling*, **155**, 85–94.
- Montoya-Burgos JI (2003) Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, **12**, 1855–1867
- Morita K, Yokota A (2002) Population viability of stream-resident salmonids after habitat fragmentation: a case study with white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) by an individual based model. *Ecological Modelling*, **155**, 85–94.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Reviews in Ecology Systems*, **18**, 269–292.
- Mota SQ, Ruffino ML (1997) Biologia e pesca do Curimatá (*Prochilodus nigricans* Agassiz, 1829) (Prochilodontidae) no médio Amazonas. *Revista UNIMAR*, **19**, 493-508.

- Moyer GR, Winemiller KO, Mcphee MV, Turner TF (2005) Historical demography, selection, and coalescence of mitochondrial and nuclear genes of *Prochilodus* species of Northern South America. *Evolution*. **59**, 599-610.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **55**, 335-350.
- Mundy NI, Winchell CS, Woodruff, DS (1996). Tandem repeats and heteroplasmy in the mitochondrial DNA control region of the loggerhead shrike (*Lanius ludovicianus*). *Journal of Heredity*. **87**, 21–26.
- Nazia AK, Suzana M, Azhar H, Nguyen Thuy TT, Siti Azizah MN (2010) No genetic differentiation between geographically isolated populations of *Clarias macrocephalus* Günther in Malaysia revealed by sequences of mtDNA Cytochrome b and D-loop gene regions. *Journal of Applied. Ichthyology*. **26**. 568–570.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Neraas L, Spruel P (2001) Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology*. **10**, 1153–1164.
- Nguyen TTT, Ingram BA, Sungan S, Gooley G, Sim SY, Tinggi D, De Silva SS (2006) Mitochondrial DNA diversity of broodstock of two indigenous mahseer species, *Tor tambroides* and *T. douronensis* (Cyprinidae) cultured in Sarawak, Malaysia. *Aquaculture*, **253**, 259–269.
- Nguyen TTT (2008) Population structure in the highly fragmented range of *Tor douronensis* (Cyprinidae) in Sarawak, Malaysia revealed by microsatellite DNA markers. *Freshwater Biology*, **53**, 924–934.


- Northcote TG (1995) Comparative biology and management of Arctic and European grayling (Salmonidae, *Thymallus*). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. **5**, 141–194.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry*. **35**, 81–100.
- Posada D, Crandall KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. **14**, 817-818.
- Potter PE (1997) The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a Natural History. *Journal of South American Earth Sciences*, **10**, 331-344.
- Ramella MS, Kroth MA, Meurer S, Nuñez APO, Zaniboni-Filho E, Arisi ACM (2006) Genetic Variability in Four Fish Species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **4**, 589-598.
- Rand DM (1993) Endotherms, ectotherms, and mitochondrial genome-size variation. *Journal of Molecular Evolution*, **37**, 281–295.
- Rand DM, Harrison RG (1989) Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets. *Genetics*, **121**, 551–559.
- Ribeiro AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, **4**, 225-246.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552-569.
- Santos GM, Mérona B, Juras AA, Jêgu M (2004). *Peixes do baixo Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica de Tucuruí*. Brasília. Eletronorte. 216p.
- Seutin G, White BN, Boag PT (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, **69**, 82-90.

- Sivasundar A, Bermingham E, Ortí G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, **10**, 407–417
- Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Population. *Genetics*, **129**, 555-562.
- Solignac M, Monnerot M, Mounolou, JC (1983) Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, **80**, 6942-6946.
- Staden R (1996). The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, **5**, 233–241.
- Swofford DL (1991) PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1 Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, **105**, 437-460.
- Taphorn DC (1992). The characiform fishes of the Apure River drainage, Venezuela. No. 4 Monografías, Museo de Ciências Naturales, Universidad Nacional Experimental de Los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, Guanare, Venezuela.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Tucci CEM, Hespanhol I, Cordeiro-Netto OM (2001) *Gestão de Água no Brasil*. Brasília: UNESCO, 156 p.
- Turner TF, Mcphee MV, Campbell P, Winemiller KO (2004) Phylogeography and interspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers in North South America. *Journal of Fish Biology*. **64**, 186-201.

- Weitzman SH, Weitzman MJ (1982) *Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory*. Columbia University Press, New York, p. 403-422.
- Wilkinson, GS, Chapman A. M. (1991) Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA. *Genetics*, **128**, 607–617.
- Yan L, Wang D, Fang Y (2008) Genetic diversity in the bronze gudgeon, *Coreius heterodon*, from the Yangtze River system based on mtDNA sequences of the control region. *Environmental Biology of Fishes*, **82**, 35–40.
- Yossa MI, Araujo-Lima CARM (1998) Detritivory in two Amazonian fish species. *Journal of Fish Biology*. **52**, 1141–1153.
- Zhang SM, Wang DQ, Zhang YP (2003) Mitochondrial DNA variation, effective female population size and population history of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Conservation Genetics*, **4**, 673–683.

FIGURAS



Figura 1. Mapa com a distribuição espacial aproximada dos pontos de coleta ao longo do rio São Francisco. Números representam os locais de coleta e as barras vermelhas () as barragens das usinas hidrelétricas. No sentido Montante/Jusante são elas: Trés Marias, Sobradinho, Luiz Gonzaga, Paulo Afonso e Xingó.

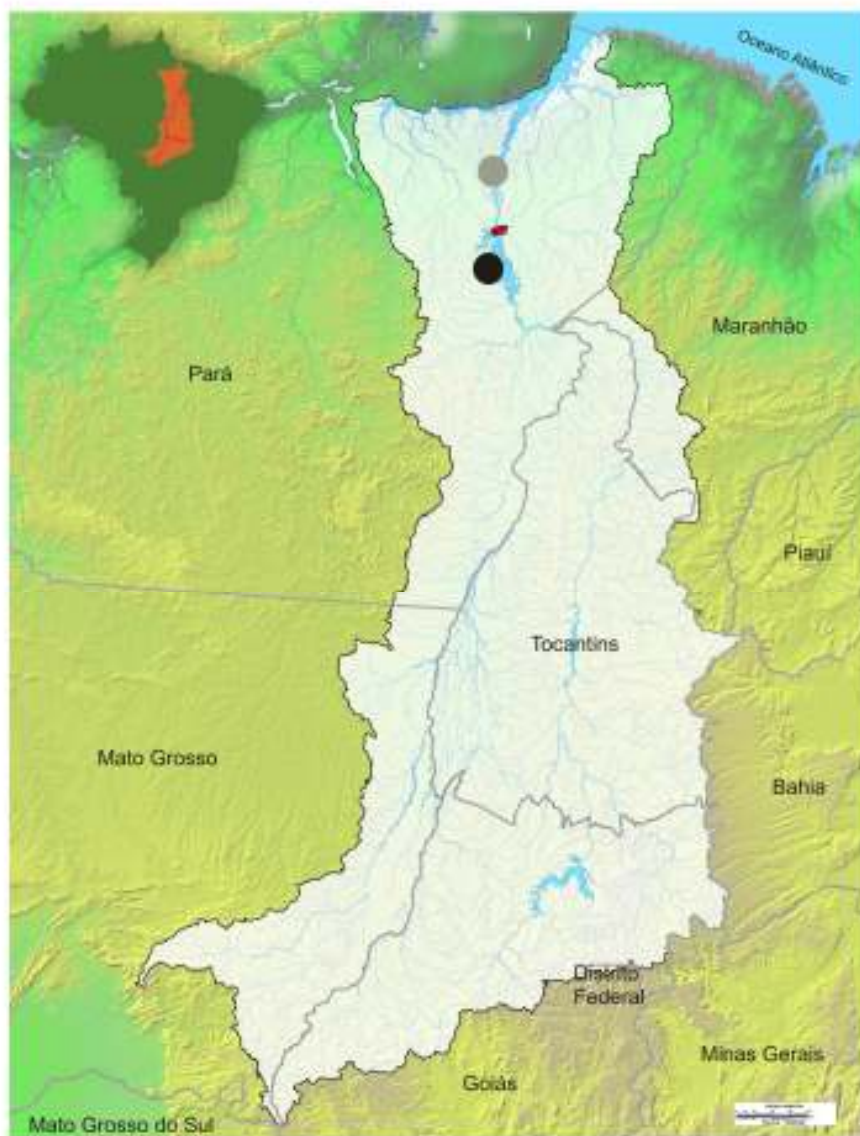



Figura 2. Distribuição espacial dos pontos de coleta a montante (círculo preto) e a jusante (círculo cinza) da barragem da UHE de Tucuruí ().

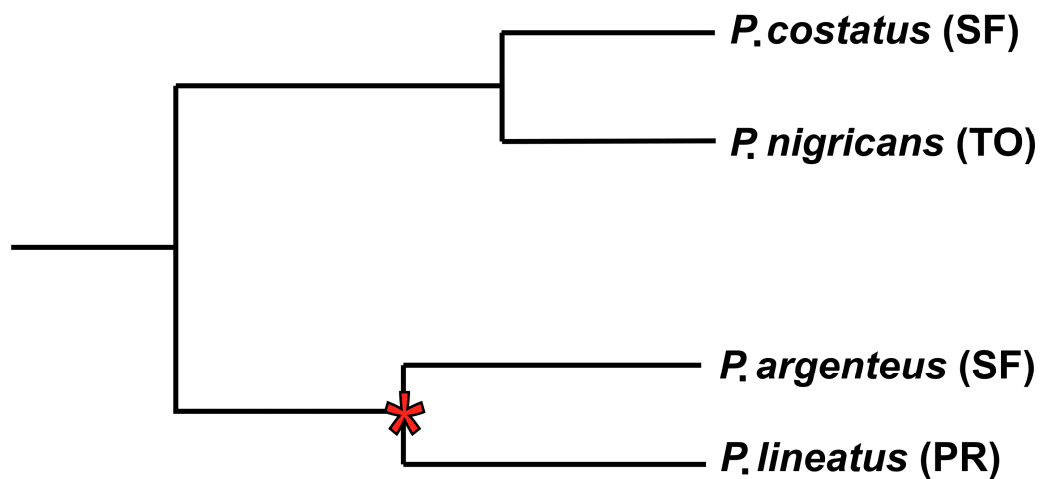


Figura 3. Árvore esquemática do relacionamento filogenético observado entre as seqüências de D-loop das espécies de *Prochilodus* em diferentes bacias hidrográficas analisadas para o cálculo da taxa de mutação para o fragmento de DNA. O asterisco em vermelho é referente ao evento geológico de conexão (5,7 – 6,4 ma) entre as bacias dos rios Paraná e São Francisco relatados em Montoya-Burgos (2003).

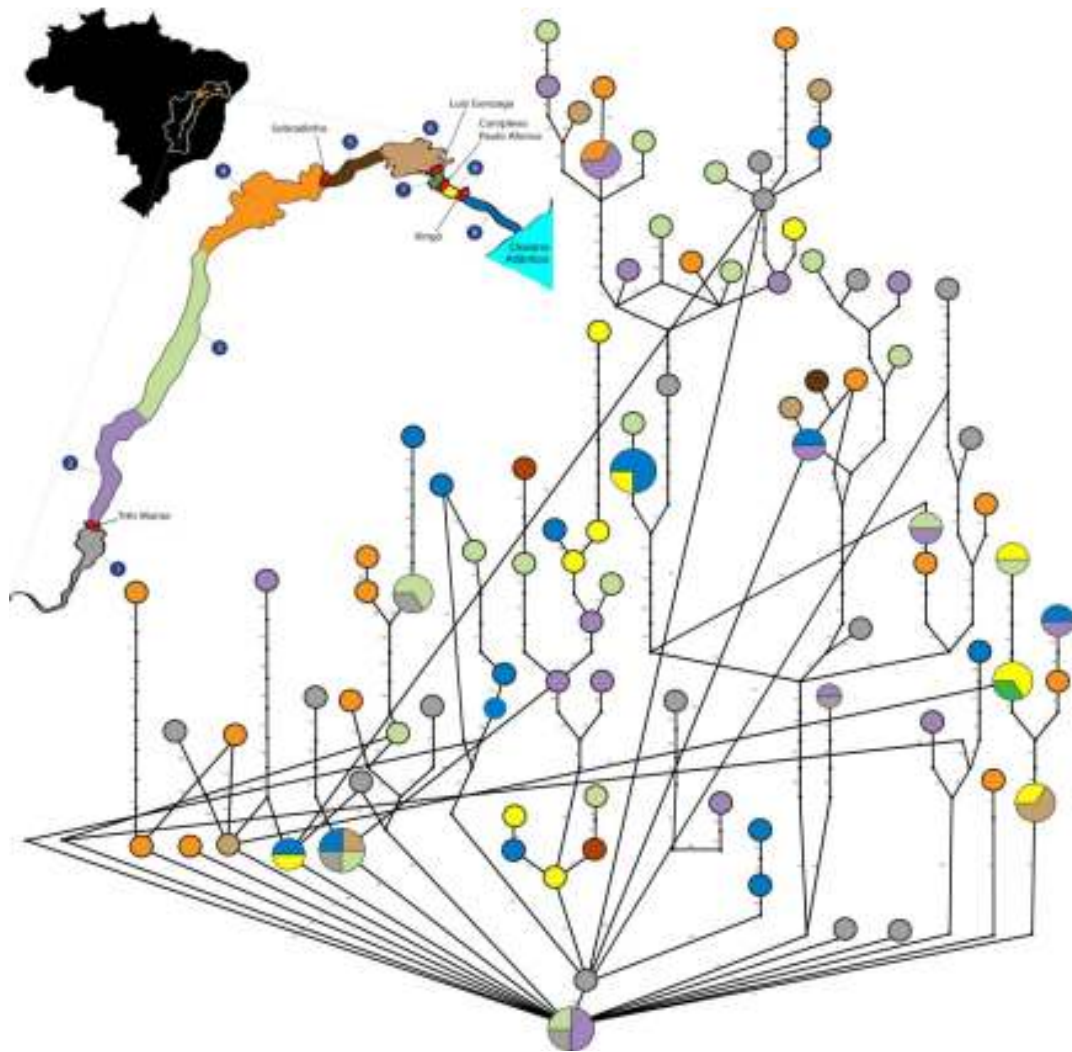


Figura 4. Rede de haplótipos de *Prochilodus argenteus*, mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos no rio São Francisco. Referente a alinhamento de 391pb de 113 indivíduos, a partir do fragmento da Região Controladora mitocondrial (D-loop).

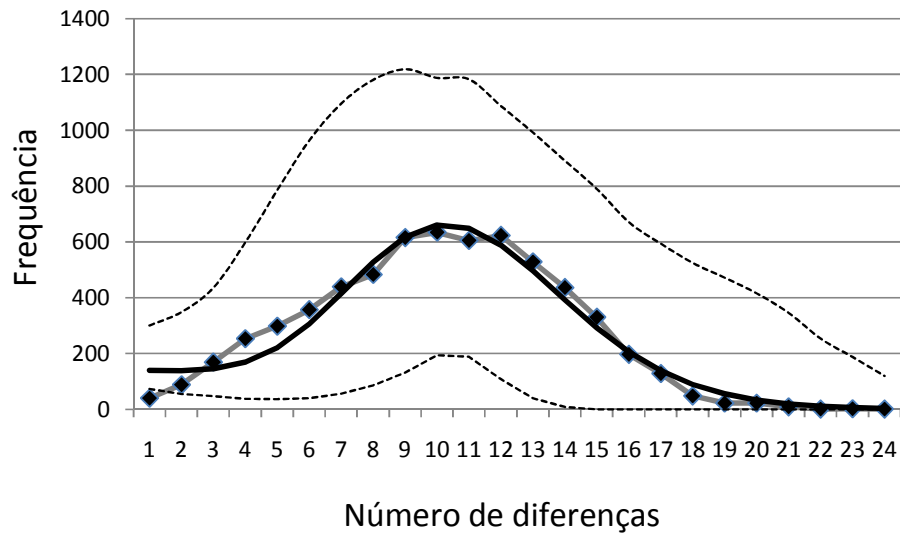


Figura 5. Gráfico das distribuições das diferenças pareadas (*Mismatch Distribution*) com todas as localidades agrupadas. Os losangos representam os dados observados, a linha inteira o modelo e as linhas pontilhadas o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).

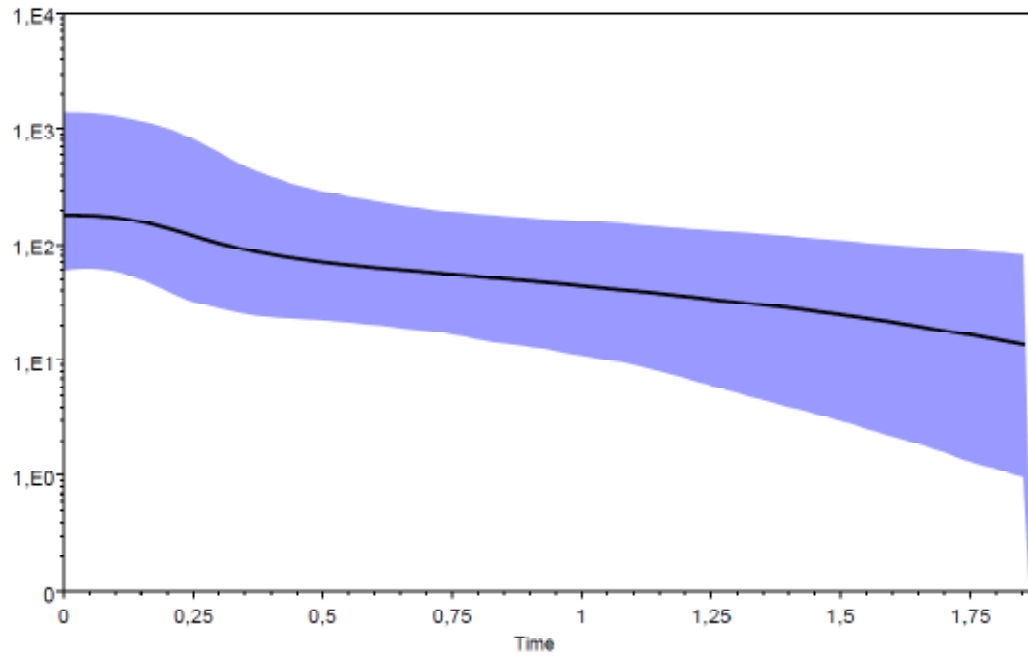


Figura 6. Bayesian Skyline Plotting para a População de *Prochilodus argenteus* no Rio São Francisco.

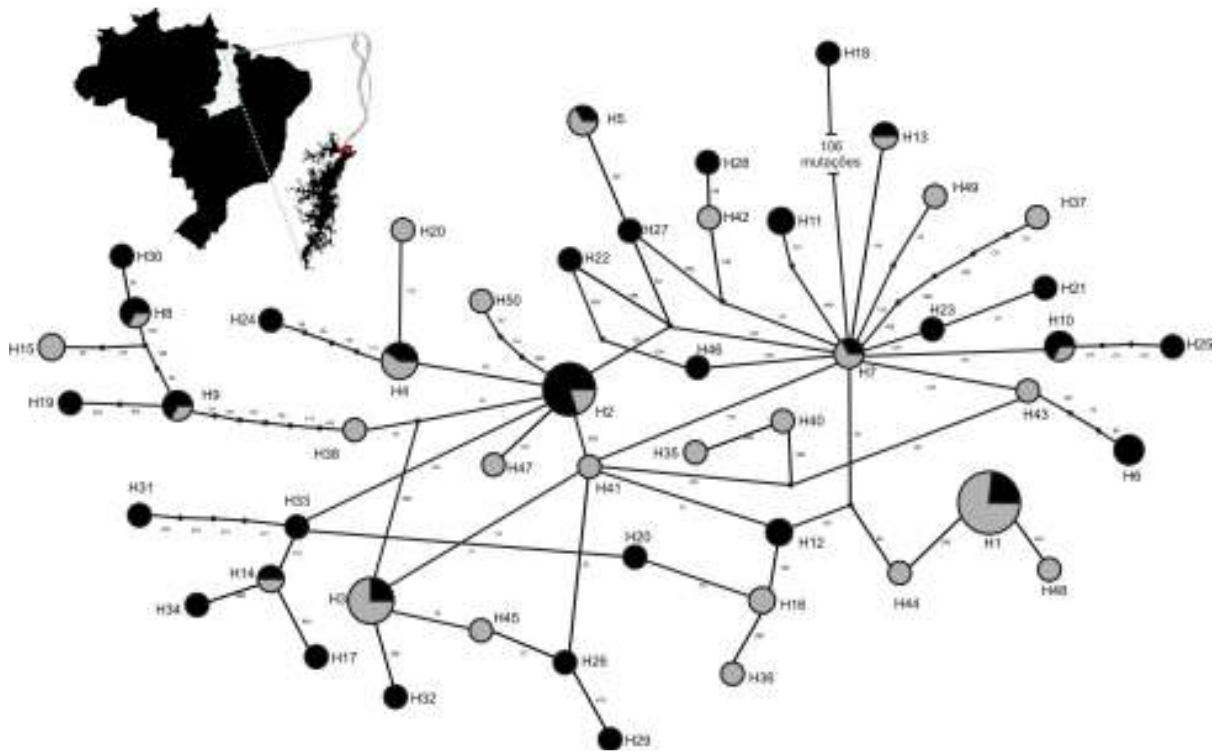


Figura 7. Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de *Prochilodus nigricans*. Cada círculo representa uma seqüência singular de DNA (haplótipo), sendo seu tamanho proporcional a sua frequência absoluta; as linhas demonstram como cada um está relacionado aos outros. Círculos separados por uma única linha diferem por apenas uma mutação. Os pequenos círculos brancos representam mutações adicionais. As cores presentes em cada haplótipo representam sua frequência a montante (preto) e/ou jusante (cinza) da UHE de Tucuruí.

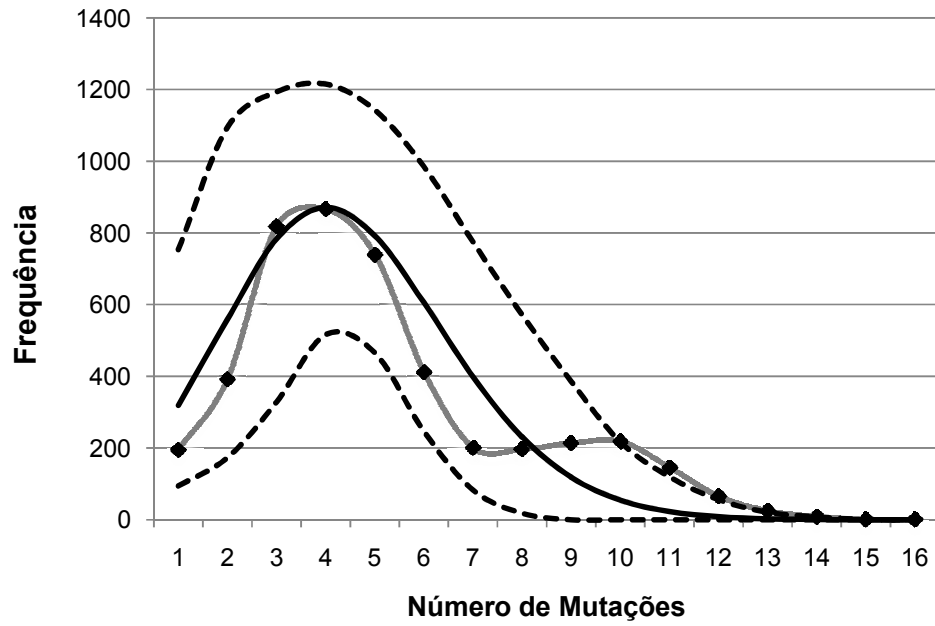


Figura 8. Gráfico das distribuições das diferenças pareadas (*Mismatch Distribution*) para o fragmento Região Controladora do DNA mitocondrial (D-loop) de *P. nigricans*. Os losangos representam os dados observados, a linha inteira o modelo e as linhas pontilhadas os intervalos de confiança ($\alpha=0,05$).

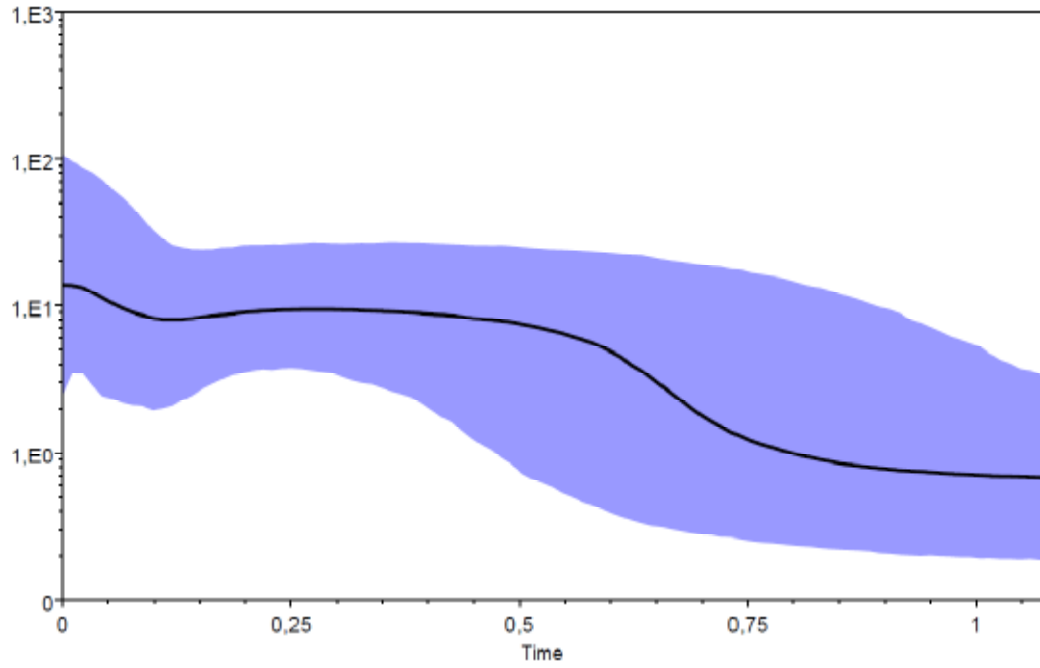


Figura 9. Bayesian Skyline Plotting para a População de *Prochilodus nigricans* no Rio Tocantins.

TABELAS

Tabela I. Usinas Hidrelétricas do Rio São Francisco e suas datas de implantação.

<i>Usina</i>	<i>Ano de Implantação</i>
Três Marias	1961
Sobradinho	1977
Luiz Gonzaga	1988
Paulo Afonso	1955
Xingó	1994

Tabela II. Número de indivíduos de *P. argenteus* coletados e coordenadas dos pontos amostrais do Rio São Francisco.

<i>Ponto de coleta</i>	<i>Número de Indivíduos</i>	<i>Coordenadas</i>	<i>Município</i>
1	20	18°14'35"S/045°14'02"W	Três Marias (MG) (montante da barragem)
2	20	18°11'17"S/045°15'07"W 15°29'30"S/044°21'33"W	Três Marias (MG) à Januária (MG) (jusante da barragem)
3	20	13°15'12"S/043°25'30"W	Bom Jesus da Lapa (BA)
4	20	09°26'20"S/040°49'54"W	Sobradinho (BA)
5	20	09°24'36"S/040°30'04"W	Juazeiro (BA)
6	20	08°59'25"S/038°13'37"W	Petrolândia (PE) (Lago de Itaparica)
7	20	09°11'10"S/038°16'46"W e 09°23'24"S/038°14'14"W	Jatobá (PE) e Paulo Afonso (BA) (entre Itaparica e Paulo Afonso)
8	20	09°30'36"S/038°00'29"W	Xingozinho (BA) (entre Paulo Afonso e Xingó)
9	20	10°12'40"S/36°50'25"W	Propiá (SE) (Jusante a Xingó)

Tabela III. Informações referentes aos indivíduos de *P. nigricans* amostradas no rio Tocantins.

Ponto de coleta	Número de indivíduos	Coordenadas	Município
Montante a UHE de Tucuruí	50	4°11'14,18"S/49°44'27,10"W	Pucuruzinho
Jusante a UHE de Tucuruí	50	4°19'44,61"S/49°47'44,50"W	Baião

Tabela IV. Nomes e respectivas seqüências de nucleotídeos dos primers utilizados na amplificação da região controladora (D-Loop).

Nome do Primer	Seqüência de nucleotídeos
xiraF1	5'-ACTCCACCACTAACTCCCAAAGCT -3'
xiraR1	5'-ARCAKTTGGTGGTCTCTTACTAC -3'

Tabela V. Número de indivíduos seqüenciados de *Prochilodu argenteus* (n), número de haplótipos (nh) e diversidade de nucleotídeos (π) apresentados pelas subpopulações nos nove pontos de coleta, assim como em todos os pontos juntos.

Ponto amostrado	Número de indivíduos (n)	Número de Haplótipos (nh)	Diversidade Nucleotídica
1	19	19	0,018551 +/- 0,010164
2	18	15	0,026866 +/- 0,014373
3	20	14	0,026802 +/- 0,014248
4	18	17	0,027253 +/- 0,014566
5	1	1	0,000000 +/- 0,000000
6	7	5	0,016893 +/- 0,010411
7	1	1	0,000000 +/- 0,000000
8	11	7	0,018509 +/- 0,010605
9	18	11	0,022767 +/- 0,012315
todos	113	90	0,025792 +/- 0,013147

Tabela VI. Análise de variância molecular (AMOVA).

<i>Fonte de variação</i>		<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Variância</i>	<i>Varição(%)</i>	<i>p</i>
Entre populações	8	34,675	-0,01873	-0,41	0,42059±0.004
Entre indivíduos das populações	104	474,184	4,55946	100,41	

Fst: -0,00413 p: 0,62574 -/+ 0,00492

Tabela VII. Valores obtidos através dos testes de neutralidade seletiva, N = tamanho da amostra, S = número de sítios variáveis, P_i = média das diferenças pareadas. *P. argenteus*

<i>Testes</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Valores</i>
	N	113
	S	96
Tajima (1989)	P_i	9,08676
	D	-1,62493
	P_D	0,02260
	Nº de alelos observados	113
Fu (1997)	Nº de alelos esperados	24,07851
	F_S	-24,54076
	P_F	0,0000

Tau : 8,424
 Theta0: 2,136
 Theta1: 45,918
 Nef: 8009

Tabela VIII. Número de indivíduos seqüenciados de *Prochilodus nigricans* (n), número de haplótipos (n_h) e diversidade de nucleotídeos (π) em cada ponto de coleta, assim como nos pontos amostrais em conjunto.

<i>Ponto de coleta</i>	<i>Número de indivíduos sequênciados (n)</i>	<i>Número de haplótipos (n_h)</i>	<i>Diversidade de nucleotídeos (π)</i>
Montante	50	32	0,0147 ± 0,0079
Jusante	50	29	0,0123 ± 0,0067
Todos os pontos	100	14	0,0133 ± 0,0071

Tabela IX. Resultado da AMOVA realizada com dados haplotípicos das populações de *Prochilodus nigricans*.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>G. L.</i>	<i>Soma</i> <i>Quadrados</i>	<i>Componente</i> <i>de Variação</i>	<i>Porcentagem</i> <i>da Variação</i>
Entre as populações	1	3,52	-0,0043Va	-0,1153
Dentro das populações	99	366,04	3,7351Vb	100,1153
Total	100	369,56	3,7308	

Índice de fixação F_{ST} : -0,00115

Tabela X. Valores obtidos através dos testes de neutralidade seletiva para o fragmento da Região Controladora do DNA mitocondrial (D-loop) de *Prochilodus nigricans*. N = tamanho da amostra, S = número de sítios variáveis, P_i = média das diferenças pareadas.

<i>Testes</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Valores</i>
	N	100
	S	61
Tajima (1989)	Pi	7,06
	D	-1,7739 ± 0,90
	P _D	0,0121
	Nº de alelos observados	100
	Nº de alelos esperados	20,45
Fu (1997)	F _S	-24,8311
	P _F	0,000
	Tau:	4,650
	Theta0:	0,000
	Theta1:	35,234
	Nef:	6355