Riviane Garcez da Silva

Filogenia da família Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes, 1998 (Ostariophysi, Characiformes) e história demográfica de *Rhaphiodon vulpinus* (Cynodontinae) baseadas em marcadores moleculares

Phylogeny of the family Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes, 1998 (Ostariophysi, Characiformes) and demographic history of *Rhaphiodon vulpinus* (Cynodontinae) based on molecular markers

São Paulo

2011

Riviane Garcez da Silva

Filogenia da família Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes, 1998 (Ostariophysi, Characiformes) e história demográfica de *Rhaphiodon vulpinus* (Cynodontinae) baseadas em marcadores moleculares

Phylogeny of the family Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes, 1998 (Ostariophysi, Characiformes) and demographic history of *Rhaphiodon vulpinus* (Cynodontinae) based on molecular markers

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo.

Co-orientadora: Dra. Daniela Calcagnotto

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Silva, Riviane Garcez

Filogenia da família Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes, 1998 (Ostariophysi, Characiformes) e história demográfica de *Rhaphiodon vulpinus* (Cynodontinae) baseadas em marcadores moleculares

177 pp.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Cynodontidae 2. Relações filogenéticas 3. Filogeografia I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr (a).

Prof.(a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo
Orientadora

Dedicatória

*Ao meu amado esposo, Mauro
Por me fazer mais feliz a cada dia.
E à minha querida família,
Pelo apoio de sempre*

Agradecimentos

Durante estes quatro anos de trabalho muita coisa mudou na minha vida, me apaixonei, casei e vivo a felicidade no dia-a-dia. As viagens à região amazônica me fizeram sentir o incentivo, a hospitalidade, a alegria e a bondade do ser humano, do brasileiro, dos pesquisadores, dos ribeirinhos, dos pescadores, das muitas pessoas que tive a oportunidade conhecer durante o trabalho sobre um grupo majoritariamente amazônico. Gostaria de agradecer a todos que participaram deste momento da minha vida:

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro dado a este projeto (141934/2007-7) através de Cotas dadas ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade de São Paulo (USP). Agradeço também a FAPESP pelos projetos concedidos à Profa. Dra. Lurdes F. de Almeida-Toledo.

À Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida-Toledo, por ter me guiado durante toda minha vida acadêmica, pela confiança no trabalho desenvolvido, pelo apoio nos momentos difíceis, pela companhia nos States, e por tudo mais que não tenho palavras... Obrigada.

À Dra. Daniela Calcagnotto por ter aceitado me co-orientar neste trabalho, espero que se orgulhe tanto quanto eu, pois você forneceu contribuições que tornaram este resultado final possível. Sem você o caminho teria sido muito mais árduo. Agradeço pelas nossas conversas, pelo seu carinho e pela sua confiança.

Aos professores do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e do Departamento de Zoologia, em especial, à Profa. Dra. Monica de Toledo Piza Ragazzo, pela idéia inicial do projeto e pelo acompanhamento e carinho constantes, que proporcionaram grande aprendizado. Ao Prof. Dr. Fernando Portella de Luna Marques, por fornecer as amostras do Peru.

Agradeço a todos os companheiros do curso NT 264A – microssatélites para estudos genéticos de eucariotos: um curso teórico e prático oferecido pelo programa de pós-graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) sob a coordenação dos professores Michel Vincentz (CBMEG), Anete Pereira de Souza (CBMEG) e Maria Imaculada Zucchi (IAC/ESALQ/USP/DGM). Agradeço em especial à Profa. Anete e ao Danilo Augusto Sforça por me receberem e auxiliarem durante a clonagem por eletroporação numa segunda etapa da construção da biblioteca de

microssatélites que foi realizada no Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP) sob o consentimento da Profa. Dra. Maria Cristina Arias e com o auxílio de Elaine A. Françoso, as quais agradeço muito.

Ao Prof. Dr. Cláudio Oliveira da Universidade Estadual Paulista (UNESP-Botucatu), por fornecer amostras de tecidos de *Gilbertolus maracaiboensis* e *Cynodon gibbus*, à Dra. Daniela Calcagnotto por *Roestes molossus* e diversos outros grupos externos; ao Prof. Dr. Mark H. Sabah (Academy of Natural Science of Philadelphia, EUA) por *Cynodon meionactis*; e à Profa. Dra. Janice Muriel Cunha (UFPA-Bragança) por *Roestes itupiranga*.

Agradeço aos pesquisadores Luiz Roberto Malabarba e Javier Alejandro Maldonado Ocampo por fornecerem informações sobre coletas no Rio Uruguai e na Colômbia, e também ao IBAMA, às secretarias do Meio Ambiente e à Polícia Federal (especialmente nas fronteiras) pelo apoio prestado em todos os locais por onde passei. Foram tantas as pessoas que conheci ao longo das coletas realizadas que espero não me esquecer de ninguém. Em Jupiá, SP, contei com a ajuda dos amigos sempre presentes Vania Pretti (na sua última coleta do mestrado) e Carlos Eduardo Lopes, além do pescador Gil.

Em Manaus (AM), sempre contei com o suporte e carinho de todos, especialmente dos pesquisadores Jorge Ivan Rebelo Porto e Eliana Feldberg e todos do Laboratório de Genética Animal do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA). Não tenho palavras para agradecer toda a ajuda de vocês nas primeiras coletas deste projeto, minhas primeiras na região amazônica. Agradeço por terem me recebido como pesquisadora visitante, possibilitando a utilização da infraestrutura do INPA, o que facilitou muito a coleta. Agradeço também aos pesquisadores Alberto Akama e José Alves Gomes e ao pescador Roberval (o mais experiente que tive o prazer de conhecer e de reencontrar em Porto Velho).

Em Boa Vista (RR), fui recepcionada pelo pesquisador Sylvio Romério Briglia Ferreira e toda a equipe do INPA da base Roraima. Agradeço especialmente a Paulo Atlântico e ao pescador Joca que me ajudaram no campo em Mucajaí. Em Porto Velho (RO), fui recepcionada pela pesquisadora Carolina Rodrigues da Costa Doria e toda a equipe do Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), onde foi realizada uma parceria para obtenção de amostras de tecido provenientes de um projeto com a empresa

Santo Antônio Energia. Agradeço especialmente a Luiz Jardim de Queiroz e Cristhiana Paula Röpke pela amizade e hospedagem durante o período.

Em Barcelos (AM), fui recepcionada pelo secretário do Meio Ambiente Julio Siqueira e contei com a ajuda dos pescadores José Alberto e Pinheiro da comunidade Daraquá. Já em Tabatinga (AM), fui recepcionada pelo Augusto da Colônia de Pescadores de Tabatinga e contei com a ajuda e simpatia do pescador Peres e sua família. A coleta no Araguaia e no baixo Xingu contou com a parceria de Julio Cesar Santana, grande companheiro e pesquisador, sempre levantando o ânimo mesmo nos momentos mais difíceis. Em Barra do Garças (GO) agradeço aos pesquisadores Paulo Cesar Venere e Issakar Lima Souza da Universidade Federal do Mato-Grosso pela ajuda e hospitalidade. Agradeço também ao pescador Jason e aos donos da Pousada Água Santa, Cida e José. Em Canarana (MT) agradeço aos donos Lídio e Fernando da Pousada Alto Xingu por abrirem a pousada para nós mesmo em cima da hora, e por disponibilizarem seus funcionários Ilma, Luiza e Divino (pescador) para nos ajudar.

Em Altamira (PA), fui recepcionada pela pesquisadora Janice Muriel Fernandes Lima da Cunha e toda a equipe de Biologia da Universidade Federal do Pará (UFPA), e contei com a ajuda e amizade de um pescador fantástico e sua família, Sr. Izaltino e Dona Olga. Conhecer vocês, fazer parte do dia-a-dia da casa e interagir com a família toda foi a melhor coisa de toda a coleta. Em Foz do Iguaçu (PR), tive o imenso prazer de contar com a companhia do grande amigo Ricardo Shohei Hattori, o único no Laboratório de Ictiogenética que viajou mais do que eu. Lá conheci quase toda sua família, os prazeres da culinária japonesa e uma das Maravilhas da Natureza, as Cataratas do Iguaçu. Inesquecível.

Pela rapidez e eficiência com que desempenham seu trabalho, agradeço as especialistas em laboratório Luci Navarro, responsável pelo serviço de sequenciamento do Instituto de Química da USP, e Katia M. da Rocha, responsável pelo serviço de genotipagem do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP.

Aos grandes amigos que palpitaram ao longo do trabalho, Janice M. Cunha, George M. T. Mattox, e o casal Clarisse Palma Silva e Fabio Pinheiro, agradeço pelas dicas, idéias e trabalhos que me guiaram na fase final da tese. Agradeço especialmente a Maximiliano M. Maronna, nosso querido Max, grande amigo e padrinho. Aprendi muito com você nesse tempo de convivência, desde

programas de análise, ajuda computacional e conversas sobre novas metodologias, até músicas, filmes e conhecimento geral. Agradeço pela convivência e pela sua amizade. Aos amigos ainda não citados do Laboratório de Ictiogenética: Felipe Lourenço Claro, Marilena Peixoto, Juliana Costa Jordão, Carolina Pereira Gomes, Anita Leal Souza, e em especial, à Carlos Eduardo Lopes grande companheiro de coleta e um verdadeiro amigo para o casal, obrigado por sua ajuda nos momentos mais difíceis. Aos outros amigos da USP Danilo Aqueu Rufo e Thiago Fernandes, pelas experiências e histórias compartilhadas nesse período.

Aos amigos “externos”, que tive o prazer de conviver: Adriano Alonso, Aline Staskowian Benetti, André do Amaral Nogueira (França), Gislene Torrente Villara, Jansen Zuanon e Pedro Murilo Sales Nunes. Agradeço muito a duas amigas que acompanharam as mudanças ao longo deste processo: Sabrina Baroni, grande amiga e madrinha responsável pelo casal; e em especial à Vânia Pretti que esteve sempre presente e companheira nas experiências de vida ao longo desse período (Amazônia, microssatélites, e até casamento): suas histórias merecem um livro. Obrigado pela companhia nos momentos difíceis.

Finalmente, agradeço a minha família: meus pais, a quem devo minha educação e meu caráter; meu irmão Renato e minha cunhada Renata, por sempre quererem o melhor para mim e por terem feito as jóias Felipe e Helena (princesinha da Dinda); meu irmão Rodrigo, confidente das agruras da academia; meus sogros, Mauro e Lili, por me aceitarem como uma filha na família e por terem gerado o meu amado; meus cunhados, Neto e Ana Marcia, pelas risadas e por mostrarem que a simpatia e a união vencem qualquer obstáculo; e, claro, aos pequeninos da família, Bernardo, Felipe, Manuela e Helena, simplesmente por existirem e por proporcionarem momentos de descontração que só as crianças são capazes.

Por último, e mais importante, agradeço a meu querido esposo Mauro, por ter entrado na minha vida de forma tão natural, me conquistado e me tornado uma pessoa melhor. Cada dia com você e cada dificuldade vencida faz minha felicidade aumentar. Você é minha alma gêmea, meu amor eterno, é tudo pra mim, é algo assim... sem explicação. Obrigada pelo apoio, carinho e muita compreensão. Te amo.

Índice

Capítulo 1 – Introdução geral	1
Cynodontidae <i>sensu</i> Lucena & Menezes (1998).....	2
Considerações sobre <i>Rhaphiodon vulpinus</i>	5
O uso de técnicas moleculares em estudos filogenéticos.....	8
O uso de técnicas moleculares em estudos filogeográficos.....	10
Capítulo 2 – Filogenia molecular de Cynodontidae (<i>sensu</i> Lucena & Menezes, 1998) ...	26
Introdução	26
Objetivos	28
Material e Métodos.....	28
Resultados	30
Discussão	33
Capítulo 3 – Estrutura populacional e variabilidade genética de <i>Rhaphiodon vulpinus</i> (Characiformes) inferidas pelo seqüenciamento da região da ATPase do mtDNA.....	68
Introdução	68
Objetivos	70
Material e Métodos.....	70
Resultados	72
Discussão	75
Capítulo 4 – Obtenção e caracterização de locos de microssatélites em <i>Rhaphiodon vulpinus</i> (Cynodontidae, Characiformes) e suas aplicações em outras espécies de Cynodontinae.....	93
Capítulo 5 – História demográfica de <i>Rhaphiodon vulpinus</i> (Cynodontinae, Characiformes): evidências para a história geológica da formação das grandes bacias hidrográficas Neotropicais.....	98
Introdução	98
Objetivos	100
Material e Métodos.....	101
Resultados	104
Discussão	109
Capítulo 6 – Discussão geral e conclusões.....	144
Resumo	154
Abstract	156
Referências bibliográficas	158

Capítulo 1 - Introdução geral

A ictiofauna de água doce Neotropical é extremamente numerosa e diversificada. Estima-se que existam nesta região cerca de 6000 espécies, das quais apenas 4475, aproximadamente, estão descritas (Reis *et al.*, 2003). Entre estas, 1674 pertencem à ordem Characiformes e estão distribuídas em 18 famílias e 270 gêneros, sendo quatro famílias africanas (pelo menos 209 espécies) e o restante Neotropical (Nelson, 2006). A ordem Characiformes destaca-se dentro da ictiofauna Neotropical de água doce por apresentar considerável importância ecológica devido a sua abundância (Lowe-McConnell, 1999), assim como por participar expressivamente na economia pesqueira continental da região (Ortí & Vari, 1996).

Os Characiformes apresentam uma variada especialização ecológica evidenciada pelos diversos tamanhos, formas e hábitos alimentares de suas espécies. Acredita-se que esse grupo tenha surgido quando a África e a América do Sul constituíam um único continente denominado Gondwana (Ortí & Vari, 1996). Esta hipótese é corroborada pelos registros fósseis desse grupo, que datam de mais de 100 milhões de anos (Filleul & Maisey, 2004; Frickhinger, 1995), e também pela distribuição geográfica que inclui toda a região Neotropical e a África Central (Nelson, 2006), filogenia e distâncias genéticas entre as famílias de Characiformes (Calcagnotto *et al.*, 2005; Ortí & Meyer, 1997).

Algumas filogenias foram propostas para explicar as relações entre as famílias de Characiformes (Buckup, 1998; Calcagnotto *et al.*, 2005; Lucena, 1993; Moreira, 2007; Ortí & Meyer, 1997; Uj, 1990), entretanto estas análises apresentam poucos resultados em comum, o que demonstra a dificuldade em se obter uma filogenia que evidencie a real relação entre as famílias de Characiformes, uma das principais ordens de peixes Neotropicais.

Entretanto, um aspecto interessante nestes estudos é que as famílias de Characiformes do continente americano e aquelas encontradas no continente africano não formam dois grupos monofiléticos distintos, o que indica que esse grupo apresenta uma história biogeográfica antiga, tendo se originado antes do início da separação da Gondwana (Lundberg *et al.*, 1998). Atualmente sabe-se que um único evento vicariante não explica a atual distribuição dos Characiformes nos continentes africano e sul americano.

Os Characiformes são um bom exemplo da complexidade dos padrões evolutivos frequentemente vistos nas faunas tropicais e subtropicais, pois seu confinamento em habitats exclusivamente de água doce torna-os intimamente relacionados à dinâmica da história geológica, fazendo com que sejam um importante modelo para estudos biogeográficos.

Hubert & Renno (2006) investigaram padrões biogeográficos da ordem Characiformes e postularam a existência de 11 áreas principais de endemismo, com uma diferenciação preferencialmente leste-oeste na região amazônica (figura 1.1). Estes autores sugerem ainda que o estabelecimento da biota moderna sul-americana deste grupo de água doce é o resultado de uma interação dos processos de incursão marinha, soerguimento dos Andes e conexões históricas permitindo a dispersão entre drenagens.

Um grupo de Characiformes que apresenta uma ampla distribuição geográfica e que possui poucos estudos acerca da sua biologia é a família Cynodontidae.

Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes (1998)

A família Cynodontidae não está entre os grupos mais diversos de Characiformes, apresentando cinco gêneros e 14 espécies válidas, divididas tradicionalmente em duas subfamílias Cynodontinae e Roestinae (Lucena & Menezes, 1998). Cynodontinae é composta pelos gêneros *Cynodon*, *Hydrolycus* e *Rhaphiodon* e Roestinae por *Roestes* e *Gilbertolus* (figura 1.2). Algumas características da família são: nadadeiras peitorais relativamente expandidas, boca oblíqua e par de caninos desenvolvidos (Toledo-Piza, 2000).

A maioria dos representantes da família Cynodontidae distribui-se nas Bacias do Amazonas e do Orinoco, e em rios da encosta atlântica das Guianas (figura 1.3). *Rhaphiodon vulpinus* é o único Cynodontidae que também se distribui nas Bacias do Paraná-Paraguai e do Uruguai (figura 1.4). *Gilbertolus* distribui-se somente nas drenagens transandinas das bacias do Rio Atrato, do Rio Magdalena e do Lago Maracaibo (Colômbia e Venezuela). Fósseis de cynodontídeos datam do Mioceno, e são representados por caninos encontrados em depósitos da fauna de La Venta (localizados atualmente no vale do Rio Magdalena, Colômbia), na

Formação Anta (Quebrada de La Yesera, Salta, Argentina) e perto da cidade de Paraná (Entre Rios, Argentina) (Lundberg, 1997).

Embora os Cynodontidae não apresentem muito valor como alimento, devido ao grande número de ossificações presentes, algumas espécies podem ter importância na pesca de subsistência (Mendes dos Santos *et al.*, 1984). Além disso, os gêneros *Hydrolycus* e *Rhaphiodon* são bastante considerados na pesca esportiva. A maior parte do conhecimento acerca da biologia e dos hábitos alimentares é proveniente de estudos com Cynodontinae. Os representantes dessa subfamília vivem em águas superficiais e de meia altura em rios, lagos e florestas alagadas em todos os tipos de águas, sendo mais frequentes em águas mais transparentes. São predadores, em sua maioria piscívoros (figura 1.4), que utilizam seus caninos para segurar a presa (Arandt, 1997 *apud* Toledo-Piza *et al.*, 1999).

Tradicionalmente, as espécies de Cynodontinae têm sido classificadas em um mesmo grupo, já as espécies de Roestinae foram classificadas junto com algumas espécies de Characidae. Menezes (1974), por exemplo, considerou *Roestes*, incluindo *Gilbertolus* como sinônimo, relacionado com *Heterocharax*. Uma relação mais próxima entre Cynodontinae e Roestinae foi proposta por Howes (1976) que redefiniu Characinae, postulando duas tribos: Characini e Cynodontini (incluindo *Roestes sensu* Menezes, 1974). Lucena (1993) encontrou Cynodontinae como grupo-irmão de *Acestrorhynchus* e Roestinae como grupo-irmão de Heterocharacinae (Characidae) (figura 1.5). Entretanto, Lucena & Menezes (1998), identificaram sinapomorfias que sugerem o monofiletismo de Cynodontidae, bem como de suas duas subfamílias: Cynodontinae e Roestinae (figura 1.6).

Moreira (2007), baseado 410 caracteres morfológicos, recuperou Cynodontidae como grupo-irmão de um grupo formado por *Acestrorhynchus*, Hepsetidae e Ctenolucidae (figura 1.7). Este resultado concorda, em parte, com duas outras hipóteses: a de Lucena & Menezes (1998), que considera Cynodontidae como grupo-irmão de *Acestrorhynchus* (os autores não incluíram representantes de Hepsetidae e Ctenolucidae); e a hipótese de Netto-Ferreira (2006) que considera *Acestrorhynchus* como grupo-irmão de um clado formado por Hepsetidae e Ctenolucidae (o autor não incluiu representantes de Cynodontidae).

Mirande (2009; 2010) baseado em dados morfológicos de um grande número de Characidae e outros Characiformes, recuperou Cynodontinae (representada por *Rhaphiodon vulpinus*) dentro de Characidae e relacionada com Acestrorhynchinae, e este clado relacionado com Agoniatinae (figura 1.8). Mattox (2010), também com caracteres morfológicos, encontrou Cynodontinae relacionada com *Acestrorhynchus* e Roestinae como subfamília de Characidae, sendo composta, segundo o autor por Roestini (*Roestes* e *Gilbertolus*) e Heterocharacini (incluindo *Gnathocharax*) (figura 1.9).

O sequenciamento de DNA fornece uma grande quantidade de caracteres e foi utilizado até o momento em três análises filogenéticas distintas que incluíram representantes de Cynodontidae. Ortí & Meyer (1997) e Calcagnotto *et al.* (2005) incluíram em suas análises pelo menos um representante da subfamília Cynodontinae e recuperaram relações filogenéticas diferentes das análises morfológicas (figuras 1.10 e 1.11). O primeiro trabalho apresenta Parodontidae como grupo-irmão de Cynodontidae, enquanto que no segundo Cynodontidae é recuperado como grupo-irmão do clado (Serrasalminae (Anostomoidea (Hemiodontidae, Parodontidae))). Oliveira *et al.* (2011) também obtiveram um grande clado composto por Cynodontinae, Serrasalminae, Anostomoidea, Hemiodontidae e Parodontidae, entretanto as relações divergem entre os trabalhos, com Parodontidae como grupo-irmão do clado (Cynodontinae (Anostomoidea (Hemiodontidae, Serrasalminae))) (figura 1.12). Os autores também incluíram representantes de Roestinae e obtiveram Heterocharacinae como grupo-irmão, com Acestrorhynchidae na base deste clado (figura 1.12).

As relações filogenéticas dentro de Cynodontidae foram abordadas no âmbito das subfamílias. Lucena & Menezes (1998) propuseram que *Roestes* e *Gilbertolus* formavam um clado monofilético (a subfamília Roestinae), com Cynodontinae (formada por *Cynodon*, *Rhaphiodon* e *Hydrolycus*) como grupo-irmão (figura 1.6). Neste mesmo trabalho, os autores encontraram caracteres que suportam a monofilia de Cynodontidae, tendo *Acestrorhynchus* (gênero único da família Acestrorhynchidae) como grupo-irmão. Para este trabalho, os autores utilizaram representantes das três espécies de *Roestes*, *Gilbertolus atratoensis*, *G. maracaiboensis*, *Rhaphiodon vulpinus* e *Cynodon gibbus*, perfazendo um total de 7 espécies analisadas entre as 14 espécies da família Cynodontidae. Não foi

possível estabelecer as relações filogenéticas entre as três espécies de *Roestes*, (figura 1.6).

Os Cynodontinae passaram por uma revisão sistemática realizada por Toledo-Piza *et al.* (1999) e por Toledo-Piza (2000), onde três gêneros foram reconhecidos (*Hydrolycus*, *Cynodon* e *Rhaphiodon*) e um total de oito espécies foram consideradas válidas. A monofilia da subfamília Cynodontinae e dos seus gêneros foi verificada baseando-se em estudos osteológicos detalhados. A árvore mais parcimoniosa possui 66 passos (CI = 0,86 e RI = 0,92), e propõe *Cynodon* como grupo-irmão de *Rhaphiodon*, e este clado como grupo-irmão de *Hydrolycus*. *Roestes* e *Gilbertolus* (ambos Roestinae) seriam os grupos relacionados, tendo *Acestrorhynchus* como grupo-irmão; porém há caracteres ambíguos suportando esta filogenia (figura 1.13).

Considerações sobre *Rhaphiodon vulpinus*

Rhaphiodon é um gênero monotípico (*R. vulpinus*) pertencente à subfamília Cynodontinae (Cynodontidae, Characiformes), e é a única espécie da subfamília presente na Bacia Amazônica e na Bacia do Paraná. As características que o distinguem dos outros gêneros são: posição da nadadeira dorsal no terço posterior do comprimento do corpo (distância pré-dorsal entre 69,3 e 74,4 do comprimento padrão versus 52,2 a 61,1 nos outros cynodontíneos); corpo muito alongado em relação à altura (altura do corpo na origem da dorsal entre 12,7 e 19,6 do comprimento padrão versus 19,1 a 33,7 nos outros cynodontíneos); e número elevado de vértebras (de 62 a 68 versus de 44 a 54 nos outros cynodontíneos) (Toledo-Piza, 2000).

R. vulpinus é conhecido no Brasil pelos nomes populares de *dourado-cachorro*, *peixe-cachorro* ou *facão* devido aos grandes dentes caninos que apresenta. Habita tanto reservatórios quanto os rios de águas correntes (Agostinho *et al.*, 2003). No reservatório de Itaipu, esta espécie é mais abundante acima dos 5 m da coluna d'água e é importante na pesca artesanal (FUEM/Nupelia/Itaipu Binacional, 1998).

Esta espécie alcança um comprimento superior a 70 cm, com a primeira maturação aos 40 cm (Perez-Lizama, 1994) e a migração ocorre entre outubro e janeiro com pico de atividade em novembro (Neuberger *et al.*, 2007) quando os

ovários representam mais de 15 % do peso corporal (Suzuki, 1992), e contém uma média de 98.185 oócitos com média de 0,98 mm de diâmetro (Neuberger *et al.*, 2007). *R. vulpinus* é piscívoro e se alimenta em ambiente lótico a noite, geralmente caçando cardumes de pequenos characídeos. No estômago dos juvenis, o segundo item mais encontrado são os invertebrados (Agostinho *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 1997). Do ponto de vista da biologia da conservação, predadores, assim como alguns decompositores e detritívoros, podem ser considerados espécies-chave para o ecossistema, pois estão nas extremidades da cadeia alimentar (Rozzi *et al.*, 2001). Por isso, faz-se necessário o conhecimento sobre a biologia e variabilidade genética dessas espécies, a fim de formular planos de ação de visem à conservação de ambientes ameaçados.

R. vulpinus apresenta uma ampla distribuição, ocorrendo nas bacias dos rios Amazonas, Tocantins, Capim, Orinoco, Rupununi, Paraná-Paraguai e Uruguai (Toledo-Piza, 2000) (figura 1.4). A autora afirma que as variações nas características merísticas e morfométricas são grandes (com diferentes graus de sobreposição) e são distribuídas de forma contínua em toda a área de distribuição dessa espécie. Entretanto, três espécimes do alto Rio Xingu apresentaram características distintas e que, de acordo com Toledo-Piza, mereciam análises mais detalhadas.

As espécies de água doce apresentam uma distribuição naturalmente fragmentada devido à hidrografia, o que limita o fluxo gênico entre populações que ocupam drenagens diferentes. Além disso, muitas espécies tiveram sua distribuição alterada ao longo da formação dos sistemas de drenagem atuais (i.g. formação de cachoeiras) ou por modificações antrópicas (i.g. barragens).

A fragmentação do habitat tem um papel decisivo na estruturação populacional das espécies de água doce, pois ocasiona, normalmente, uma redução do tamanho populacional. O tamanho populacional reduzido em populações isoladas pode levar a uma perda mais acentuada da variabilidade genética e da heterozigosidade, quando comparada com populações de maior tamanho, além disso, outra consequência da fragmentação é o aumento da divergência entre os isolados. Segundo Agostinho *et al.* (2005) as razões para o declínio da biodiversidade nas águas continentais brasileiras incluem poluição e eutrofização, sedimentação, represas e controle de inundações, pesca e introdução de espécies; sendo estes problemas mais comuns em regiões mais

desenvolvidas, como a região das bacias do Paraná-Paraguai e do Uruguai. Dessa forma, o ambiente natural acaba sendo fragmentado, intercalando áreas favoráveis com áreas desfavoráveis.

Espécies migradoras possuem um tamanho populacional maior do que espécies sedentárias, pois uma única população pode ocupar uma ampla área de distribuição em determinada drenagem, entretanto, populações que ocupam grandes áreas estão também mais suscetíveis à fragmentação do hábitat. Apesar da distribuição de *R. vulpinus* em grandes sistemas de drenagem que estão isolados atualmente, não existem estudos acerca do potencial migratório dessa espécie, embora Agostinho *et al.* (2003) a relatem como fracamente migradora devido à sua movimentação pela escada de peixes da UHE de Itaipu.

O fluxo gênico exerce uma grande importância na caracterização da estrutura populacional de uma espécie, pois determina até que ponto uma população pode ser considerada uma unidade evolutiva independente (Slatkin, 1993). Ou seja, o fluxo gênico intenso homogeneiza as frequências alélicas enquanto o fluxo gênico restrito ou ausente pode fazer com que cada população evolua de modo independente.

Além da mobilidade, outros fatores que exercem influência na estrutura de populações são: a) a presença de barreiras físicas ou ecológicas; b) características comportamentais, como filopatria; c) história de vida do organismo (ex. catádromo); d) padrões de dispersão e fluxo gênico ligado ao sexo (nos casos de marcadores genéticos com transmissão uniparental); e) influência diferencial da seleção natural em locos nucleares e mitocondriais; f) eventos demográficos que rompem o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética; g) distância geográfica entre subpopulações (Avise, 1994).

Em estudos populacionais, o uso combinado de marcadores mitocondriais e nucleares é fundamental, pois permite um conhecimento mais amplo da real estrutura de uma população.

O uso de técnicas moleculares em estudos filogenéticos

Com o advento das técnicas moleculares foi possível efetuar análises filogenéticas baseadas em sequências de macromoléculas, o que vem auxiliando no entendimento da história evolutiva de várias espécies, incluindo os peixes (Alves-Gomes *et al.*, 1995; Calcagnotto *et al.*, 2005; Farias *et al.*, 2000; Lavoue & Sullivan, 2004; Miya *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2011; Sivasundar *et al.*, 2001), pois em muitos casos revelam um grau maior de variabilidade quando comparados aos caracteres morfológicos que tendem a ser mais conservados entre as espécies.

O DNA mitocondrial mtDNA tem se mostrado um marcador molecular eficiente em análise de zonas de contato e de fluxo gênico (Wong *et al.*, 2004); estimativas do grau de variabilidade genética intra e interpopulacional e intra e interespecífica (Iguchi *et al.*, 1999; Triantafyllidis *et al.*, 1999); modelos de biogeografia histórica (Hausdorf, *et al.*, 2011; Ikeda & Taniguchi, 2002) e caracterização de estrutura populacional (Iervolino *et al.*, 2010; Garcez, 2006), além do seu emprego crescente na inferência de relações filogenéticas entre espécies próximas (Sivasundar *et al.*, 2001; Fernandes-Matioli, 1999) e em estudos de conservação genética (Beheregaray *et al.*, 2003; Iervolino *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2005).

Análises com o mtDNA, por exemplo, têm fornecido valiosas contribuições para a sistemática filogenética dos peixes elétricos sul-americanos. Alves-Gomes *et al.* (1995) aplicaram métodos de inferência filogenética para analisar as sequências de bases dos genes mitocondriais 12S rRNA e 16S rRNA (genes mais conservados) de 19 gêneros da ordem Gymnotiformes, verificando que a hipótese filogenética baseada nos dados moleculares difere, em alguns aspectos, da hipótese baseada em estudos morfológicos. Nesse caso, uma nova filogenia foi proposta, utilizando uma combinação de dados moleculares, morfológicos e fisiológicos.

Atualmente, o número de trabalhos que associam marcadores mitocondriais e nucleares está em expansão, tanto em estudos de estrutura populacional e fluxo gênico (Cooke *et al.*, 2009; FitzSimmons *et al.*, 1997; Hausdorf, *et al.*, 2011; Orbach & Gaffney, 2000; Strecker *et al.*, 2012) quanto em estudos filogenéticos (Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et*

al., 2011; Pereira *et al.*, 2002). Os genes mitocondriais apresentam uma taxa de mutação de 5 a 10 vezes maior do que os genes nucleares (Ballard & Whitlock, 2004), entretanto, importância do emprego de genes nucleares em estudos filogenéticos reside no fato de os mesmos proporcionarem uma estimativa independente da história evolutiva da espécie em estudo.

Além disso, a falta de independência dos genes mitocondriais, devido à ausência de recombinação, e as altas taxa de substituição de nucleotídeos podem ocasionar homoplasias (Pereira *et al.*, 2002), por isso análises de grupos mais distantes requerem a inclusão de genes nucleares. A análise combinada de ambos os genomas pode ajudar a resolver as relações filogenéticas que nenhum dos dois genomas sozinho pôde resolver, pois podem estar atuando em diferentes níveis, ou seja, em diferenciações mais antigas ou mais recentes (Pereira *et al.*, 2002). Segundo Doyle (1992), a congruência entre as topologias obtidas por diferentes conjuntos de dados sugere que a árvore de genes reflete a árvore de espécies, ou seja, a reconstrução filogenética baseada em um grande conjunto de dados produz resultados mais robustos do que aquela baseada em um pequeno conjunto de dados.

Dessa forma, tendo em vista que estudos recentes indicam que uma abordagem filogenética utilizando genes mitocondriais e nucleares fornece maior consistência quanto à obtenção da topologia correta, propomos aqui o estudo das relações filogenéticas da família Cynodontidae (*sensu* Lucena & Menezes, 1998), utilizando sequências mitocondriais e nucleares. Este grupo ainda não foi objeto de uma investigação acerca das relações filogenéticas entre todas as espécies que o compõe. As relações entre as espécies foram propostas apenas no âmbito das subfamílias, e foram baseadas em dados morfológicos. O intuito desse trabalho é comparar a filogenia obtida com aquelas disponíveis na literatura, e testar a hipótese do monofiletismo de Cynodontidae proposta por Lucena & Menezes (1998).

O uso de técnicas moleculares em estudos filogeográficos

Vários modelos foram propostos para descrever a estrutura de populações subdivididas (com base no padrão de migração entre elas). São eles: a) modelo continente-ilha, onde o fluxo unidirecional ocorre de uma população de tamanho maior para subpopulações menores; b) modelo de ilha, onde há fluxo em todos os sentidos e com igual frequência entre populações de mesmo tamanho; c) modelo de alpondras (*stepping-stone*), onde a migração ocorre entre subpopulações imediatamente vizinhas; d) modelo de metapopulações, que incorpora eventos regulares de extinção e colonização; e) isolamento por distância, onde, em uma população de distribuição contínua, o fluxo gênico diminui à medida que a distância aumenta.

Além disso, a estrutura de uma população pode ser observada em termos hierárquicos progressivamente inclusivos (indivíduo, subpopulação, população total), ou seja, a variabilidade genética de uma espécie pode estar distribuída em cada um dos níveis hierárquicos (Frankham *et al.*, 2002).

Para quantificar o efeito da redução de heterozigosidade causada pela subdivisão populacional e pelo endocruzamento em cada nível hierárquico, Wright (1951) desenvolveu a estatística F (composta por três coeficientes – F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}). Entre estes, o F_{ST} é o índice mais informativo, pois fornece uma estimativa do grau de divergência genética entre duas subpopulações. Slatkin (1995) desenvolveu um índice análogo ao F_{ST} (o R_{ST}) para ser utilizado em dados de microssatélites, já que se baseia no modelo de mutação *stepwise*.

Entretanto, atualmente existe uma abordagem mais poderosa do que a estatística F. Esta abordagem, baseada no sequenciamento, é a árvore de haplótipos, que, segundo Templeton *et al.* (1995), fornece maior precisão nas estimativas de fluxo gênico, pois permite a diferenciação da estrutura populacional por forças recorrentes (como fluxo gênico e deriva genética) ou por eventos históricos (como a fragmentação e a expansão de área). No entanto, é muito provável que o índice F_{ST} continue a ser usado como uma medida importante para estimativas comparativas de fluxo gênico, dada a sua fundamental importância teórica (Neigel, 2002).

Marcadores moleculares são muito utilizados em pesquisas de estrutura populacional, especialmente após desenvolvimento da PCR (que necessita de

quantidades mínimas de DNA) e do sequenciamento automático, que levou à descrição de várias classes de marcadores mais variáveis. Atualmente existem diversos marcadores genéticos disponíveis para análises de estrutura populacional, associados tanto ao genoma nuclear (i.g. microsátélites) como ao genoma mitocondrial.

O DNA mitocondrial (mtDNA) é um marcador adequado para estudos evolutivos, pois possui como características: um genoma compacto com estrutura e organização simples, ausência de íntrons, pseudogenes e elementos transponíveis, alta taxa de substituição de nucleotídeos, herança predominantemente materna, conservação do conteúdo gênico e facilidade de purificação, devido ao fato de possuir várias cópias por célula (Avice *et al.*, 1987). O mtDNA tem sido usado extensivamente nas últimas décadas como uma ferramenta para inferir o passado evolutivo e demográficos de populações e espécies (Garcez *et al.*, 2011; Iervolino *et al.*, 2010; Iguchi *et al.*, 1999; Ikeda & Taniguchi, 2002; Triantafyllidis *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2004). Esta ferramenta mostrou-se muito importante para os novos campos da ecologia molecular e filogeografia. (Ballard & Whitlock, 2004).

A partir de estudos prévios de divergência do mtDNA foi proposto que os indivíduos, ao invés das populações, poderiam ser tratados como unidades taxonômicas operacionais (OTUs) em estudos de genética de populações, ou seja, conceitos e abordagens filogenéticas poderiam ser aplicados no nível intra-específico, pois as linhagens mtDNA dentro de cada espécie aparecem muitas vezes estruturadas geograficamente (Avice *et al.*, 1987). Essas observações levaram à proposição do termo “filogeografia”, cunhado por Avice *et al.* (1987), que se refere ao estudo dos princípios e processos que governam as distribuições geográficas das linhagens genealógicas, especialmente no nível intra-específico.

Muitos trabalhos foram desenvolvidos com base na abordagem filogeográfica, e métodos de análise mais sofisticados foram propostos, como, por exemplo, a análise de clados agrupados (Templeton *et al.*, 1995).

Lu *et al.* (2006) analisaram a estrutura genética de *Xiphias gladius* dos oceanos Pacífico e Índico, com base no sequenciamento da região controle do mtDNA. Os autores detectaram uma significativa subdivisão populacional, postulando a existência de um grupo na área ao norte de Madagascar, um grupo na Baía de Bengala, e um grupo no resto do Oceano Índico e a oeste do Pacífico.

Aboim *et al.* (2005) analisaram as sequências parciais da região D-loop e *cytb* de cinco amostras [Açores, Madeira, Portugal (Peniche), Cabo Verde e noroeste do Atlântico] de *Helicolenus dactylopterus*. Os autores encontraram diferenciação genética entre o par Açores/nordeste do Atlântico e as populações de Cabo Verde e noroeste do Atlântico, além de observarem expansão populacional nas populações de Açores e nordeste do Atlântico.

Nos últimos anos, entretanto, tem crescido a consciência de que a inferência baseada apenas no mtDNA nem sempre é suficiente para responder todas as questões interessantes, já que árvores baseadas no mtDNA descrevem apenas uma pequena fração acerca da história evolutiva de um organismo (Rieseberg, 2000). Por isso, alguns autores argumentam que mais marcadores genéticos são necessários para responder mais perguntas filogeográficas. (Ballard & Whitlock, 2004).

Uma opção ao mtDNA são os genes nucleares, entretanto, o uso destes representa um desafio devido a: (1) dificuldades técnicas associadas com o isolamento individual de haplótipos para genes nucleares diplóides; (2) baixas taxas de evolução em sequências nucleares, produzindo, assim, muito poucos sítios informativos para a reconstrução filogenética intra-específica; (3) recombinação, o que mistura histórias mutacionais; e (4) um aumento da média dos tempos de coalescência para alelos em locos autossômicos, significando que muitos clados recuperados pelo mtDNA não serão detectados pelos genes nucleares (Rieseberg, 2000).

Como muitos autores são unânimes em afirmar que a técnica de microsatélites possui grande poder de resolução para fornecer hipóteses consistentes a respeito da estruturação populacional, esta técnica foi escolhida para o estudo populacional de *Rhaphiodon vulpinus*.

Nos últimos anos, tem-se observado um crescimento do número de trabalhos que relatam o isolamento e a caracterização de locos de microsatélites em espécies de peixes neotropicais, com a finalidade de empregá-los em estudos de genética de populações e conservação (Beheregaray & Sunnucks, 2000; Calcagnotto *et al.*, 2001; Moysés *et al.*, 2005).

Os microsatélites, também conhecidos na literatura como SSR (*simple sequence repeats*) ou STR (*short tandem repeats*), são sequências curtas de DNA, de 1 a 6 pares de base, repetidas em *tandem* e dispersas pelo genoma

nuclear (Li *et al.*, 2002). O tamanho dessas sequências repetitivas é, em geral, inferior a 200 pares de base.

A técnica de microssatélites consiste na amplificação dos locos de microssatélites utilizando-se *primers* específicos desenhados a partir de uma biblioteca Genômica, que pode ser da espécie em estudo ou de espécies próximas (Zardoya *et al.*, 1996). Entre as características dos microssatélites que são vantajosas para estudos populacionais estão: a abundância no genoma nuclear; o alto grau de polimorfismo, exibindo altos números de alelos e de heterozigosidade (Wright & Bentzen, 1994), e as altas taxas de mutação, que variam de 10^{-5} a 10^{-2} mutações/ loco/ geração, enquanto as taxas estimadas para sequências nucleares variam de 10^{-10} a 10^{-9} e de 10^{-9} a 10^{-8} para sequências mitocondriais (Hancock, 1999; Moritz *et al.*, 1987; Weber & Wong, 1993).

Os microssatélites têm sido utilizados com sucesso em uma série de abordagens, tais como: caracterização da estrutura populacional (Escalona, *et al.*, 2009; Moysés, 2005); estimativas do tamanho populacional efetivo e ocorrência de endocruzamento (Estoup *et al.*, 2001); estudos de fluxo gênico local (Hausdorf *et al.*, 2011; Waldbieser & Wolters, 1999) e análise de relações evolutivas entre populações e espécies (Natoli *et al.*, 2004; Strecker *et al.*, 2012).

Natoli *et al.* (2004) analisaram a estrutura populacional de nove amostras de *Tursiops truncatus*, baseados em microssatélites e sequenciamento do mtDNA. Os autores encontraram diferenciação entre todas as amostras, e menor variabilidade em habitats costeiros, que muitas vezes se mostraram diferentes das linhagens pelágicas. Além disso, duas populações costeiras que recentemente foram classificadas como uma nova espécie (*T. aduncus*) apresentaram uma grande diferenciação entre si e entre o morfotipo de *T. truncatus*, o que sugere que possam existir três espécies de *Tursiops*.

Dionne *et al.* (2008) analisaram amostras de *Salmo salar* de 51 rios da costa Atlântica Norte Americana com 13 locos de microssatélites. Os autores identificaram sete grupos distintos geneticamente e geograficamente, caracterizados por diferentes fatores ambientais e ecológicos, principalmente a temperatura. Os resultados sugeriram que a interação entre fluxo gênico e adaptação ao regime termal explicam a estrutura genética hierárquica observada entre as populações de salmão do Atlântico.

Semelhanças e diferenças genéticas entre populações (ou grupos de populações) representam fontes principais de informação para avaliar a história evolutiva de uma espécie, proporcionando, ao mesmo tempo, uma visão do estado atual e do potencial evolutivo futuro. Por outro lado, compreender quais os fatores ecológicos e evolutivos que influenciam a estrutura genética e quantificar as suas escalas espaciais de influência está se tornando tão importante quanto a mera descrição da diferenciação genética. (Dionne *et al.*, 2008).

Assim, análises filogeográficas de grupos de peixes que apresentam grandes áreas de distribuição proporcionam informações para a reconstrução de eventos históricos que originaram a sua diversificação (Montoya-Burgos, 2003). A espécie *Rhaphiodon vulpinus* possui uma ampla distribuição populacional ocorrendo em sistemas de drenagens diferentes, estando, assim, fragmentada. Dessa forma, *R. vulpinus* é um organismo adequado para investigar modificações geológicas e ambientais passadas, já que a dispersão dos peixes está intimamente relacionada a ligações diretas ou captura de cabeceiras entre bacias adjacentes, o que, por sua vez, reflete mudanças geomorfológicas ou climáticas (Bermingham & Martin, 1998). Por isso, o estudo para verificar se há estruturação populacional em *Rhaphiodon vulpinus* é de grande importância, além de aumentar o conhecimento acerca da ictiofauna de água doce Neotropical.

Figura 1.1: Caracterização das áreas de endemismo postuladas por Hubert & Renno (2006). a) Árvore de consenso das relações entre as 11 áreas de endemismo encontradas; b) Mapa evidenciando as 11 áreas de endemismo identificadas pela análise de máxima parcimônia; c) Refúgios aquáticos (elipses, I-VIII), paleoarcos (a-f) e rotas de dispersão (setas, 1-7) postuladas pelos autores.

Figura 1.2: Representantes dos três gêneros de Cynodontinae (caixa roxa) e dos dois gêneros de Roestinae (caixa laranja). Fotos retiradas de www.hippocampus-bildarchiv.de

Figura 1.3: Mapas da América do Sul mostrando a distribuição geográfica de: a) Cynodontinae (extraído de Toledo-Piza, 2000); b) Roestinae (extraído de Menezes & Lucena, 1998). Alguns círculos representam mais de um lote de espécimes ou localidades.

Figura 1.4: a) Mapa da América do Sul mostrando a distribuição geográfica de *Rhabiodon vulpinus*. Alguns círculos representam mais de um lote de espécimes ou localidades (extraído de Toledo-Piza, 2000). b) Exemplar de *Hydrolycus scomberoides*, evidenciando a boca oblíqua e o par de caninos desenvolvidos. c) Exemplar de *Rhabiodon vulpinus* segurando sua presa. As imagens b e c foram retiradas de OPEFE (2006).

Figura 1.5: Cladograma obtido por Lucena (1993). Em vermelho realçamos os representantes de Roestinae (*Roestes*) e de Cynodontinae (*Cynodon* e *Rhaphiodon*).

Figura 1.6: Cladograma de consenso estrito obtido por Lucena & Menezes (1998) a partir de dezoito árvores mais parcimoniosas com 80 passos (CI = 0.60 e RI = 0.81).

Figura 1.7: Cladograma de consenso estrito obtido por Moreira (2007). Os números são os valores de Bremer obtidos. Em vermelho realçamos os representantes de Roestinae (*Roestes molossus* e *Gilbertolus atratoensis*) e de Cynodontinae (*Hydrolycus tatauaia*).

Figura 1.8: Cladograma obtido por Mirande (2009). Em vermelho realçamos o posicionamento da família Cynodontidae (representada apenas por Cynodontinae).

Figura 1.9: Cladograma de consenso estrito obtido por Mattox, 2010 (L=697, IC = 0.30 e IR = 0.74) obtido na análise de máxima parcimônia sem *Priocharax*. Em destaque, a região na análise com *Priocharax* (L=697, IC = 0.30 e IR = 0.74) que difere da primeira análise.

Figura 1.10: Cladograma obtido por Ortí & Meyer (1997). Em vermelho realçamos o posicionamento da família Cynodontidae (representada apenas por Cynodontinae).

Figura 1.11: Cladograma obtido por Calcagnotto *et al.* (2005). Em vermelho realçamos o posicionamento da família Cynodontidae (representada apenas por Cynodontinae).

Figura 1.12: Cladograma obtido por Oliveira *et al.* (2011).

Figura 1.13: Árvore mais parcimoniosa obtida por Toledo-Piza (2000). Caracteres ambíguos são representados por dois asteriscos, e caracteres homoplásticos são representados por um asterisco.

Capítulo 2 - Filogenia molecular de Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes, 1998

Introdução

A ictiofauna de água doce Neotropical é extremamente numerosa e diversificada, com 4475 espécies descritas (Reis *et al.*, 2003), sendo 1674 Characiformes. A família Cynodontidae (*sensu* Lucena & Menezes, 1998) não está entre os grupos mais diversos de Characiformes, mas apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo composta por cinco gêneros e 14 espécies válidas tradicionalmente divididas em duas subfamílias Cynodontinae e Roestinae (Lucena & Menezes, 1998). Recentemente, Oliveira *et al.* (2011) questionaram o monofiletismo de Cynodontidae, mas mantiveram o monofiletismo das subfamílias.

Os Roestinae incluem espécies que alcançam o comprimento máximo 20 cm e são representados por três espécies de *Roestes* (*R. itupiranga*, *R. molossus* e *R. ogilviei*) e três de *Gilbertolus* (*G. alatus*, *G. maracaiboensis* e *G. atratoensis*) (Menezes & Lucena, 1998). Os Cynodontinae incluem exemplares com mais de 70 cm de comprimento, e são compostos por três gêneros *Hydrolycus*, *Cynodon* e *Rhaphiodon* e um total de oito espécies válidas (*H. armatus*, *H. wallacei*, *H. tatauaia*, *H. scomberoides*, *C. gibbus*, *C. septenarius*, *C. meionactis* e *R. vulpinus*) (Toledo-Piza *et al.*, 1999; Toledo-Piza, 2000).

Com exceção do gênero *Gilbertolus* (que é restrito às drenagens transandinas das bacias do Rio Atrato, do Rio Magdalena e do Lago Maracaibo), a maioria dos outros cynodontídeos distribui-se nas bacias do Amazonas e do Orinoco, e em rios da encosta atlântica das Guianas (figura 1.3). *Rhaphiodon vulpinus* também se distribui nas bacias do Paraná-Paraguai (figura 1.4). O grupo apresenta uma origem que data (pelo menos) do Mioceno, já que fósseis de caninos foram encontrados na Colômbia e na Argentina (Lundberg, 1997).

Análises filogenéticas que incluíram representantes de Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes, 1998 divergem em relação ao monofiletismo do grupo, com algumas propondo outros clados como grupo-irmão para cada subfamília, que parecem ser monofiléticas. Nas filogenias morfológicas,

Cynodontinae aparece relacionada à Acestrorhynchidae (Lucena, 1993; Lucena & Menezes, 1998; Moreira, 2007; Mirande, 2009; Mirande, 2010; Mattox, 2010), enquanto que Roestinae aparece como grupo-irmão ou de Cynodontinae (Howes, 1976; Lucena & Menezes, 1998; Moreira, 2007), ou de Heterocharacinae (Menezes, 1974; Lucena, 1993; Mattox, 2010).

As filogenias moleculares apresentam em comum o não reconhecimento do grupo Cynodontinae/Acestrorhynchus, como proposto nas análises morfológicas. Ortí & Meyer (1997) recuperam Parodontidae como grupo-irmão de Cynodontinae, enquanto que Calcagnotto *et al.* (2005) e Oliveira *et al.* (2011) recuperaram um clado composto pela superfamília Anostomoidea (*sensu* Buckup, 1998), Hemiodontidae, Serrasalminidae, Parodontidae e Cynodontinae, entretanto, a relação entre os grupos diverge nos trabalhos. Oliveira *et al.* (2011) também incluíram representantes de Roestinae e obtiveram Heterocharacinae como grupo-irmão, com Acestrorhynchidae na base deste clado.

As relações filogenéticas dentro de Cynodontidae foram abordadas no âmbito das subfamílias (utilizando caracteres morfológicos) por Lucena & Menezes (1998) (Roestinae) e por Toledo-Piza (2000) (Cynodontinae). Lucena & Menezes (1998), apesar de não resolverem as relações entre as espécies de *Roestes* e *Gilbertolus*, propuseram o monofiletismo do grupo (Roestinae), com Cynodontinae como grupo-irmão e Acestrorhynchidae como grupo relacionado, com caracteres suportando o monofiletismo destes clados. As relações entre Cynodontinae, Roestinae e Acestrorhynchidae foram recuperadas por Toledo-Piza (2000) que também averiguou o monofiletismo de Cynodontinae e dos seus gêneros, propondo *Cynodon* como grupo-irmão de *Rhaphiodon*, e este clado como grupo-irmão de *Hydrolycus* (*H. wallacei* (*H. scomberoides* (*H. armatus* *H. tatauaia*))).

Tendo em vista que o sequenciamento de genes para fins filogenéticos vem auxiliando no entendimento da história evolutiva de várias espécies de peixes (Alves-Gomes *et al.*, 1995; Calcagnotto *et al.*, 2005; Farias *et al.*, 2000; Lavoue & Sullivan, 2004; Oliveira *et al.*, 2011; Sivasundar *et al.*, 2001), propomos aqui o estudo das relações filogenéticas de Cynodontidae (*sensu* Lucena & Menezes, 1998), utilizando sequências mitocondriais e nucleares. O intuito desse trabalho é elucidar as relações entre as espécies reconhecidas,

assim como discutir as relações entre os gêneros de Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes, 1998 e outros Characiformes, para averiguar o monofiletismo ou não dessa família, bem como de suas subfamílias, comparando os dados obtidos com aqueles disponíveis na literatura.

Objetivos

Testar a monofilia de Cynodontidae como proposta por Lucena & Menezes (1998) com base em marcadores moleculares, e como objetivos específicos de:

1. Propor uma hipótese das relações filogenéticas entre as espécies de Cynodontidae;
2. Identificar o posicionamento filogenético de Cynodontidae em relação a outros Characiformes;
3. Comparar as relações filogenéticas encontradas com aquelas disponíveis na literatura.

Material e Métodos

A tabela 2.1 mostra as sequências utilizadas na análise filogenética e as tabelas 2.2, 2.3 e 2.4 mostram a origem dos indivíduos sequenciados no presente estudo. Para tanto, o DNA total dos exemplares foi extraído com protocolo de extração salina (Aljanabi & Martinez, 1997), a partir de tecidos do fígado, músculo, coração ou nadadeiras, preservados em álcool 96%.

Foram utilizados dados de sequências de nucleotídeos de dois genes mitocondriais (16S e ATPase), e o primeiro íntron do gene nuclear que codifica para a proteína ribossomal S7 (RPS7). A sequência dos *primers* é apresentada na tabela 2.5.

As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf (Mastercycler Gradient) ou MJ Research, INC (modelo PTC- 100™). As reações utilizadas e a descrição dos ciclos da PCR são apresentadas na tabela 2.6. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo e fotografado digitalmente sob luz ultravioleta.

O DNA amplificado foi purificado seguindo o protocolo do *Kit* de purificação ChargeSwitch PCR Clean-Up (Invitrogen). A incorporação de bases marcadas, para posterior sequenciamento, também seguiu as indicações do *Kit* Big Dye Sequence Terminator (v. 3.1, Applied Biosystems Inc.), utilizando os mesmos *primers* da reação de amplificação.

Foram sequenciadas as fitas *forward* e *reverse* de cada exemplar analisado e sempre que possível, foram analisados dois exemplares de cada espécie. O sequenciamento das regiões escolhidas foi realizado no sequenciador automático do Instituto de Química da USP/SP, ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer, Hitachi. As sequências obtidas foram editadas com o auxílio do programa *Geneious Pro 5.3.5* (Drummond *et al.*, 2011), através de inspeções visuais com a análise simultânea das fitas *forward* e *reverse*, e seus respectivos eletroferogramas. Esta etapa foi essencial para a identificação e correção de possíveis erros de leitura eletrônica.

Na comparação entre duas sequências da mesma espécie, no caso de haver polimorfismos de um nucleotídeo, uma sequência consenso foi utilizada e o polimorfismo codificado de acordo com o código de ambiguidade do IUPAC-IUP. As sequências de bases obtidas foram comparadas às bases de dados do GenBank, utilizando o programa Blastn, para a confirmação de similaridade com as regiões gênicas de interesse. Os alinhamentos foram realizados utilizando as sequências obtidas e as sequências disponíveis no GenBank tanto para as regiões alvo quanto para o gene mitocondrial citocromo b (*cytb*), o gene da subunidade alfa da cadeia pesada da miosina muscular cardíaca (*myh6*) e o gene ativador da recombinação 2 (*rag2*). Estes alinhamentos foram realizados com o algoritmo Muscle (Edgar, 2004), utilizando a configuração padrão do programa Geneious Pro 5.3.5 (Drummond *et al.*, 2011) e após o alinhamento as sequências foram novamente visualizadas, concatenadas e conferidas no programa SeaView 4.1 (Galtier *et al.*, 1996).

Árvores foram geradas para cada região gênica a fim de verificar o monofiletismo dos gêneros antes do agrupamento para a análise filogenética final. As análises foram realizadas pelo método de máxima parcimônia, através dos programas PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2001) e TNT (Goloboff *et al.*, 2003). *Xenocharax spilurus* (Distichodontidae), quando possível, foi escolhido como

grupo externo para as análises já que em todas as filogenias de Characiformes as famílias africanas Citharinidae e Distichodontidae são encontradas em posição basal. Todos os *gaps* foram tratados como dados ausentes (*missing*) e não foi atribuído peso aos caracteres, os quais foram considerados como não ordenados.

A árvore mais parcimoniosa foi encontrada pelo método de busca heurística com 10000 réplicas com o algoritmo TBR. Foram calculados os índices de consistência e de retenção (Farris, 1989) e os valores de *bootstrap* e do suporte de Bremer (Bremer, 1994) para os ramos da filogenia com todas as regiões e sem o íntron da RPS7 (S7).

Resultados

As análises filogenéticas das regiões gênicas escolhidas (figuras 2.1 a 2.8) evidenciaram que algumas sequências disponíveis no GenBank não constituem grupos monofiléticos com outras do mesmo gênero e por isso foram retiradas da análise concatenada, além destas, retiramos as sequências obtidas em posições distantes de táxons reconhecidamente relacionados (ver táxons destacados nas filogenias).

Na análise concatenada dos 42 táxons terminais (tabela 2.7), foram obtidos um total de 5684 pb, sendo 673 pb para o 16S, 883 pb para a ATPase, 1014 pb para o cytb, 826 pb para o myh6, 1237 pb para a rag2 e 1051 pb para o RPS7. Dentre os caracteres analisados, 2678 foram constantes e 2368 informativos para a parcimônia. Diversos *indels* foram detectados no primeiro íntron da proteína RPS7 (figura 2.9), o que gerou um questionamento a respeito da homologia obtida no alinhamento dessa região gênica. Entretanto, todas as regiões foram utilizadas na análise de máxima parcimônia, que resultou na obtenção de 20 árvores mais parcimoniosas com 15414 passos, IC = 0,349, IR = 0,365 e valores de suporte de Bremer entre -6 e 84 (figura 2.10).

De acordo com a hipótese molecular obtida, Cynodontidae não é um grupo monofilético, com Roestinae em um clado com representantes de Heterocharacinae, e Cynodontinae monofilético relacionado à Serrasalminidae, Hemiodontidae, Parodontidae, Prochilodontidae e *Loncogenys ilisha*. O clado Roestinae + Heterocharacinae aparece como grupo-irmão de Acestrorhynchidae, com *Bryconops* como clado relacionado, esse grupo aparece dentro de um ramo composto por espécies formalmente reconhecidas como Characidae. Cynodontinae aparece fora do agrupamento acima e com Serrasalminidae + Hemiodontidae como grupo-irmão (figura 2.10).

A árvore de consenso aqui obtida, com o aparecimento da espécie *Loncogenys ilisha* (Characidae, Heterocharacinae) como grupo-irmão de *Prochilodus* no clado que além de Prochilodontidae inclui Cynodontinae, Serrasalminidae, Hemiodontidae e Parodontidae, nos fez questionar a homologia dos alinhamentos.

Verificando os dados obtidos para *L. ilisha* (16S, ATPase e S7) (figuras 2.2, 2.4 e 2.5) notamos que apenas o S7 não detectava a relação com outros Heterocharacinae, além disso, apesar da alta resolução da árvore do S7 e da fidelidade dos clados em relação às outras análises, encontramos um clado que apresenta relações de parentesco absurdas com espécies de Characidae (incluindo *L. ilisha*) relacionadas às sequências de *Prochilodus* obtidas no GenBank (figura 2.5). Esta discrepância possivelmente está relacionada à dificuldade, devido ao grande número de *indels*, na obtenção das hipóteses de homologia corretas através do alinhamento pelo Muscle (figura 2.9).

Por isso, resolvemos refazer a análise concatenada sem o íntron da RPS7 (figura 2.11), o que resultou em 2470 caracteres constantes e 1676 informativos para a parcimônia, que retornaram 118 árvores mais parcimoniosas com 9842 passos, IC = 0,351, IR = 0,358 e valores de suporte de Bremer entre 0 e 49 (figura 2.11). De acordo com a nova hipótese molecular, Cynodontinae está relacionado à Serrasalminidae, Hemiodontidae, Parodontidae e Prochilodontidae, porém sem a resolução de filogenética anteriormente encontrada e também sem a presença de *Loncogenys ilisha* que aparece quebrando o monofiletismo de Roestinae e com o clado Heterocharacinae como grupo-irmão. Outro grupo que aparece melhor resolvido é Lebiasinidae + Ctenoluciidae, entretanto, dentro de Characidae,

quatro grupos (além de *L. ilisha*) alteraram seu posicionamento filogenético (*Priocharax* sp., *Aphyocharax* sp., *Roestes* sp. e *Hoplocharax goethei*), porém o novo posicionamento parece melhor refletir as relações encontradas na literatura.

Obtivemos também as árvores de consenso para as regiões mitocondriais (figura 2.12), nucleares (figura 2.13) e nucleares sem o íntron da RPS7 (figura 2.14). De uma forma geral, as sequências nucleares fornecem maior resolução do que as sequências mitocondriais. Entre as duas árvores nucleares percebe-se a perda de resolução em ramos mais basais com a exclusão do S7, além disso, as relações entre os gêneros de Characinae (figura 2.14) apresentam-se bastante diferentes daquelas encontradas na análise total, na maioria das análises individuais e também nas filogenias disponíveis na literatura, provavelmente devido ao sinal do gene *myh6* (figura 2.7). A inclusão do íntron da RPS7 gerou dois clados cujas relações discordam com as outras análises: o clado *Prochilodus* sp + *Loncogenys ilisha* (comentado acima), e o clado composto por espécies de Alestidae, Ctenoluciidae e Lebiasinidae (figura 2.13). Este clado parece ser uma quimera dos dados concatenados, já que nas análises individuais nem o S7 (figura 2.5) nem o *myh6* (figura 2.7) apresentam tal relação, com ambos posicionando o clado Ctenoluciidae + Lebiasinidae na base de um clado muito maior que inclui Alestidae.

Para estabelecer as relações entre as espécies de Cynodontinae e Roestinae utilizamos apenas sequências obtidas por nosso grupo de pesquisa, ou seja, as regiões mitocondriais 16S e ATPase e o íntron da RPS7 (figura 2.15). Obtivemos o monofiletismo de todos os gêneros, das relações intragenéricas de *Roestes*, com *R. ogilviei* como grupo-irmão de *R. itupiranga*, tendo *R. molossus* na posição basal, e também obtivemos o monofiletismo das relações intragenéricas para o gênero *Hydrolycus*, com *H. wallacei* como grupo-irmão de *H. scomberoides* e *H. armatus* como grupo-irmão de *H. tatauaia*. Cynodontinae aparece como um grupo monofilético com *Cynodon* como grupo-irmão do clado *Rhaphiodon* + *Hydrolycus*, na maioria das árvores obtidas. Roestinae não aparece monofilético em todas as análises, o que parece ser ocasionado pelo sinal dos genes mitocondriais (figuras 2.16 e 2.17),

já que o íntron da RPS7 apresenta Roestinae como grupo-irmão de Heterocharacinae (exceto *Loncogenys*) (figura 2.18).

É interessante notar que a utilização apenas de sequências próprias do S7 posicionou Prochilodontidae (representada por *Prochilodus*) como grupo-irmão de Parodontidae (representada por *Parodon*) na maioria das análises, e em um clado composto por Cynodontinae, Serrasalminidae e Hemiodontidae (figura 2.18).

Embora não fosse o objetivo do presente estudo, vale a pena comentar que recuperamos o clado *Charax* e *Roeboides* como grupo-irmão de representantes de *Cynopotamus* e *Galeocharax*, com *Phenacogaster*, *Bryconamericus*, *Exodon* e *Cheirodon* como grupos relacionados, o que condiz com a literatura disponível, entretanto, na nossa análise, *Aphyocharax* está relacionado à Characinae, podendo ser incluído na subfamília quando o íntron S7 é retirado da análise (figura 2.11).

Discussão

A filogenia final obtida (i.e. sem o íntron S7) corrobora o não monofiletismo de Cynodontidae com Cynodontinae também monofilético. Roestinae aparece junto com *Loncogenys ilisha* como grupo-irmão de Heterocharacinae, com *Acestrorhynchus* como clado relacionado, e esse grupo aparece dentro de um ramo composto por espécies formalmente reconhecidas como Characidae.

Em todas as filogenias com base em caracteres morfológicos, Cynodontinae aparece relacionado à *Acestrorhynchus* (Lucena, 1993; Lucena & Menezes, 1998; Mirande, 2010; Moreira, 2007, Mattox, 2010) enquanto que Roestinae foi considerado grupo-irmão de Cynodontinae (Howes, 1976; Lucena & Menezes, 1998; Moreira, 2007) ou de Heterocharacinae (Menezes, 1974; Lucena, 1993, Mattox, 2010). As filogenias moleculares obtiveram Parodontidae como grupo-irmão de Cynodontinae (Ortí & Meyer, 1997) ou Cynodontinae como grupo-irmão de um clado composto pela superfamília Anostomoidea *sensu* Buckup, 1998, Hemiodontidae, Parodontidae e Serrasalminidae, entretanto, as relações entre os grupos diverge nos trabalhos (Calcagnotto *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011). Oliveira *et al.* (2011) também

incluiram representantes de Roestinae e obtiveram Heterocharacinae como grupo-irmão, com *Acestrorhynchidae* na base deste clado.

É interessante notar que as filogenias moleculares apresentam em comum o não reconhecimento do grupo Cynodontinae/*Acestrorhynchus*, como proposto por todas as análises morfológicas, o que evidencia que o conhecimento acerca das relações filogenéticas de *Acestrorhynchus* ainda deve ser melhor esclarecido, especialmente considerando que os grupos supostamente relacionados a esse gênero (Cynodontinae ou Roestinae) apresentam histórias evolutivas que divergiram no início da diversificação dos Characiformes

Cynodontidae (*sensu* Lucena & Menezes, 1998)

Howes (1976) foi o primeiro a postular uma relação mais próxima entre Cynodontinae e Roestinae, com a formação da tribo Cynodontini que é parte de Characinae, juntamente com Characini. Em 1993, Lucena encontrou Cynodontinae como grupo-irmão de *Acestrorhynchus* e Roestinae como grupo-irmão de um clado formado por Heterocharacini (*sensu* Géry, 1966) e *Gnathocharax*. Entretanto, Lucena & Menezes (1998), identificaram sinapomorfias para Cynodontidae, bem como suas subfamílias: Cynodontinae e Roestinae. Moreira (2007) recuperou Cynodontidae como grupo-irmão de um clado formado por *Acestrorhynchus*, Hepsetidae e Ctenolucidae. Mais recentemente, Mattox (2010) encontrou Cynodontinae relacionada com *Acestrorhynchus* e Roestinae como subfamília de Characidae, sendo composta por Roestini (*Roestes* e *Gilbertolus*) e Heterocharacini (incluindo *Gnathocharax*). O monofiletismo de Cynodontidae também foi questionado por Oliveira *et al.* (2011) na sua filogenia molecular de Characidae, entretanto, o monofiletismo das subfamílias parece ter sido verificado (entretanto os autores incluíram poucos representantes de Heterocharacinae).

Neste estudo não corroboramos o monofiletismo de Cynodontidae, como proposto por Howes (1976), Lucena & Menezes (1998) e Moreira (2007), entretanto, corroboramos a relação entre Roestinae e o clado Heterocharacini *sensu* Géry, 1966 e *Gnathocharax*, como proposto anteriormente por Menezes (1974), Lucena (1993), Mattox (2010) e Oliveira *et al.* (2011).

Cynodontinae

Cynodontinae é monofilético, com *Hydrolycus* e *Rhaphiodon* como grupo-irmão. Toledo-Piza (2000), na única análise filogenética da subfamília realizada até o momento, propõe *Rhaphiodon* e *Cynodon* como mais proximamente relacionados, com seis sinapomorfias sustentando o clado (duas das quais são ambíguas). Entretanto, recentemente Mattox (2010) e Oliveira *et al.* (2011) incluíram representantes dos três gêneros de Cynodontinae em sua filogenia molecular de Characidae e recuperaram um grupo monofilético com as mesmas relações aqui encontradas.

Para o gênero *Hydrolycus*, obtivemos *H. wallacei* como grupo-irmão de *H. scomberoides* e *H. armatus* como grupo-irmão de *H. tatauaia*, ambos os clados com altos valores de suporte. Esse resultado difere de Toledo-Piza (2000) em relação à *H. wallacei* e *H. scomberoides*, pois a autora encontrou o clado (*H. scomberoides* (*H. armatus*, *H. tatauaia*)) (quatro sinapomorfias, sendo uma ambígua) relacionado à *H. wallacei*.

Roestinae

A única análise filogenética realizada até o momento com representantes de Roestinae (Lucena & Menezes, 1998) utilizou cinco dentre as seis espécies reconhecidas para esta subfamília, sendo dois *Gilbertolus* e três *Roestes*. Os autores encontraram dez caracteres (cinco ambíguos) suportando o monofiletismo de *Gilbertolus* e 13 caracteres (seis ambíguos) suportando *Roestes*; entretanto não obtiveram resolução suficiente para esclarecer as relações entre as espécies de *Roestes*.

O presente estudo não recupera o monofiletismo de Roestinae, já que *Gilbertolus* aparece como grupo-irmão de *Loncogenys ilisha*, entretanto o posicionamento duvidoso deste Heterocharacinae pode ser devido à presença de apenas duas fontes de informação (16S e ATPase). O monofiletismo de *Roestes* foi verificado, além disso, fomos capazes inferir sobre as relações filogenéticas entre as espécies de *Roestes*, com *R. itupiranga* e *R. ogilviei* formando um clado que apresenta *R. molossus* na posição basal.

Relação de Cynodontinae com outros Characiformes

As filogenias com base em caracteres morfológicos divergem daquelas baseadas em caracteres moleculares em relação ao posicionamento de Cynodontinae. Nas filogenias morfológicas Cynodontinae aparece relacionado à *Acestrorhynchus*, enquanto que nas filogenias moleculares Cynodontinae aparece como grupo-irmão de Parodontidae (Ortí & Meyer, 1997) ou de um clado composto por 6 famílias: Anostomoidea (*sensu* Buckup, 1998), Hemiodontidae, Parodontidae e Serrasalminidae (Calcagnotto *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011).

No presente estudo, Cynodontinae não foi recuperado como grupo-irmão de *Acestrorhynchus* (como proposto pelas filogenias morfológicas) e sim em um clado que está de acordo com a hipótese molecular, já que obtivemos Cynodontinae como um clado monofilético relacionado com Prochilodontidae, Hemiodontidae, Parodontidae e Serrasalminidae, mas sua relação estes outros grupos não pôde ser esclarecida sem a inclusão do íntron da RPS7, que possui um alinhamento cheio de *indels* e não deve ser utilizado como uma fonte de dados confiável em estudos filogenéticos com grupos muito divergentes, já que as hipóteses de homologia geradas pelo alinhamento ficam mais difíceis de serem estabelecidas com veracidade quanto maior for a distância genética entre os táxons.

Apesar dos resultados aqui obtidos e de outras filogenias moleculares (Calcagnotto *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011) apontarem para a proximidade de Cynodontinae com 6 famílias de Characiformes, as relações filogenéticas entre elas não estão esclarecidas, já que o posicionamento é alterado entre as análises. Por isso, estudos futuros devem ser realizados a fim de esclarecer o posicionamento de Cynodontinae, Hemiodontidae, Parodontidae e Serrasalminidae e Anostomoidea *sensu* Buckup, 1998.

Relação de Roestinae com outros Characiformes

Antes de Menezes (1974) nenhum autor havia apresentado evidências baseadas em características derivadas compartilhadas da relação de Roestinae com outros Characiformes. O autor considerou *Roestes*, incluindo *Gilbertolus* como sinônimo, relacionado com *Heterocharax* (Characidae).

Os resultados aqui obtidos assemelham-se aos de Menezes (1974), Lucena (1993), Mattox (2010) e Oliveira *et al.*, 2011 na relação de Roestinae com o clado formado por Heterocharacini e *Gnathocharax*; dentro de um clado que inclui espécies formalmente reconhecidas como Characidae. A inclusão de *Loncogenys* em Roestinae parece ser um artefato do uso limitado de caracteres.

A tribo Heterocharacini foi criada por Géry (1966) para incluir os gêneros *Heterocharax*, *Hoplocharax* e *Lonchogenys*. Howes (1976) propôs que *Gnathocharax* estaria mais relacionado a estes gêneros, mas sugeriu que eles poderiam ser mais relacionados aos Tetragonopterinae. Lucena (1993) corroborou a hipótese das relações de *Gnathocharax* e relacionou este gênero, junto com os Heterocharacini, a *Roestes*; numa posição mais basal em Characidae. Mirande (2009; 2010) recuperou *Heterocharax*, *Hoplocharax* e *Lonchogenys* em um clado monofilético basal de Characidae não relacionado à Characinae, levando-o a elevar a tribo à subfamília com a inclusão de *Gnathocharax* (não estudada pelo autor), entretanto, as relações deste grupo com Roestinae não foram abordadas já que o autor não os incluiu representantes dessa subfamília em suas análises.

Recentemente duas novas classificações foram propostas: com base em caracteres moleculares Oliveira *et al.* (2011) propõem que a atual composição de Acestrorhynchidae (Menezes, 2003) seja rebaixada à subfamília de uma Acestrorhynchidae mais inclusiva composta também pelas subfamílias Heterocharacinae *sensu* Mirande, 2009 e Roestinae. Por outro lado, baseado em caracteres morfológicos, Mattox (2010) recupera Acestrorhynchidae como grupo-irmão de Cynodontinae e redefine a tribo Heterocharacini *sensu* Géry, 1966 com a inclusão de *Gnathocharax*, relacionando essa tribo a outra (Roestini) formada pelas espécies de *Roestes* e *Gilbertolus*. O autor considera

Heterocharacini e Roestini tribos de Roestinae (postulada como subfamília de Characidae).

O clado Roestinae/Heterocharacinae apresentou *Acestrorhynchus* como grupo relacionado, diferindo das filogenias baseadas em caracteres morfológicos onde *Acestrorhynchus* sempre aparece como grupo-irmão de Cynodontinae, mas obviamente concordando com a filogenia de Oliveira *et al.* (2011), já que metade das regiões gênicas aqui utilizadas foi obtida do trabalho acima. Entretanto, nas análises utilizando apenas as sequências obtidas por nosso grupo de pesquisa (16S, ATPase e S7), recuperamos um clado composto por Roestinae, *Acestrorhynchus* e Heterocharacinae (exceto *Loncogenys ilisha*), sendo que a análise do íntron S7 concorda com Oliveira *et al.* (2011) de forma independente.

Além disso, Calcagnotto *et al.* (2005) não incluíram Roestinae em sua análise, mas obtiveram *Acestrorhynchus* relacionado com *Bryconops*, resultado que se assemelha ao encontrado aqui e em Oliveira *et al.* (2011), já que *Bryconops* aparece no clado grupo-irmão da família Acestrorhynchidae de Oliveira *et al.* (2011) (i.e. Acestrorhynchinae, Heterocharacinae e Roestinae), sendo composto por *Bryconops* + Iguanodectinae em Oliveira *et al.* (2011) e por *Bryconops* e *Priocharax* no presente estudo.

Priocharax é um gênero com espécies miniaturizadas (comprimento máximo de 17 mm) pouco estudado que já foi relacionado à Characinae por Lucena & Menezes (2003), mas que recentemente foi relacionado aos Heterocharacinae por Mattox (2010). Aqui obtivemos *Priocharax* em um clado fora de Characinae utilizando apenas o sinal do DNA mitocondrial (16S e ATPase) e dentro de Characinae com a inclusão do íntron da RPS7 nas análises com todas as sequências, por isso ressaltamos a importância de mais estudos filogenéticos de Characidae que incluam *Priocharax*.

Vale ressaltar que esta é a primeira análise filogenética baseada em caracteres moleculares que inclui representantes de todos os gêneros de Roestinae e Heterocharacinae *sensu* Mirande, 2009. Entretanto, este grupo foi o que sofreu o maior número de reposicionamentos com a inclusão ou não do S7, o que deve ter sido ocasionado pelo baixo número de caracteres obtidos para as espécies de Heterocharacinae. Por isso as relações entre os gêneros de Roestinae e Heterocharacinae devem ser estudadas com um maior número

de regiões gênicas antes que inferências sobre suas histórias evolutivas sejam realizadas.

Considerações sobre outras relações filogenéticas

As relações recuperadas entre os gêneros de Characinae (*sensu* Mirande, 2010) condizem em parte com dados da literatura (Javonillo *et al.*, 2010, Mattox, 2010, Mirande, 2010), já que apresenta como nova hipótese *Aphyocharax* como grupo-irmão de *Roeboides*, entretanto, a inclusão do íntron S7 reposiciona *Aphyocharax* na base de Characinae e relacionado à *Priocharax*.

O clado composto por *Charax* e *Roeboides* tem sido considerado monofilético por diversos autores (Howes, 1976; Lucena, 1993; 1998; 2000; Mirande, 2009, Mattox, 2010), assim como o clado composto por *Cynopotamus*, *Acestrocephalus* e *Galeocharax* (Lucena, 1998; 2000; Mirande, 2010; Mattox, 2010). O posicionamento de *Acanthocharax*, entretanto, era considerado incerto até Mattox (2010) que recuperou essa espécie mais relacionada ao clado formado por *Acestrocephalus*, *Cynopotamus* e *Galeocharax*, denominando este grupo de Cynopotamini e *Charax* e *Roeboides* de Characini (duas das três tribos reconhecidas pelo autor como Characinae).

As filogenias moleculares também condizem com os dados encontrados em relação à proximidade entre Characinae, Cheirodontinae e *Exodon*. Calcagnotto *et al.* (2005) obtiveram Characinae (representada por *Roeboides*) e *Exodon* como grupo-irmão, relacionado a Cheirodontinae em um clado que é grupo-irmão de representantes de Glandulocaudinae, Stevardiinae e gêneros *incertae sedis* (incluindo *Bryconamericus*). Javonillo *et al.* (2010) encontraram Characinae como grupo-irmão de *Tetragonopterus* e este clado relacionado a *Exodon*, *Aphyocharax* e Cheirodontinae em clados sequencialmente mais inclusivos. Oliveira *et al.* (2011) encontra resultados similares à Javonillo *et al.* (2010); entretanto, a inclusão de *Cynopotamus kincaidi* no clado composto por *Charax* e *Roeboides* necessita ser melhor investigada, inclusive com a revisão das sequências e com a confirmação da identificação correta da espécie.

40

Figura 2.2: Árvore consenso obtida pela análise do gene 16S através do método de máxima parcimônia com TBR. À direita, está a região destacada na árvore à esquerda. Em destaque está a sequência retirada por não constituir um grupo monofilético com outras do gênero.

Figura 2.3: Árvore consenso obtida pela análise do gene 16S através do método de máxima parcimônia com TBR. À direita, está a região destacada na árvore à esquerda. Em destaque estão as seqüências retiradas por não constituírem um grupo monofilético com outras do gênero.

Figura 2.4: Árvore consenso obtida pela análise do gene da ATPase através do método de máxima parcimônia com TBR.

Figura 2.6: Árvore consenso obtida pela análise do gene *cytb* através do método de máxima parcimônia com TBR. Em destaque está a seqüência retirada por não constituir um grupo monofilético com outra do gênero e por estar distante de táxons reconhecidamente relacionados.

Figura 2.7: Árvore consenso obtida pela análise do gene myh6 através do método de máxima parcimônia com TBR. Em destaque estão as seqüências retiradas por não constituírem um grupo monofilético com outras do gênero ou por estarem distantes de táxons reconhecidamente relacionados.

Figura 2.8: Árvore consenso obtida pela análise do gene rag2 através do método de máxima parcimônia com TBR. Em destaque estão as seqüências retiradas por não constituírem um grupo monofilético com outras do gênero ou por estarem distantes de táxons reconhecidamente relacionados.

Figura 2.9: Trecho do alinhamento pelo muscle do primeiro íntron da proteína S7 exemplificando os indels detectados.

Figura 2.10: Árvore consenso obtida pela análise concatenada dos genes 16S, ATPase, cytb, myh6, rag2 e RPS7, através do método de máxima parcimônia com TBR. Os valores de suporte de Bremer e de *bootstrap* estão na figura 2.11.

Figura 2.11: Árvore consenso obtida pela análise concatenada dos genes 16S, ATPase, cytb, myh6 e rag2 (esquerda), através do método de máxima parcimônia com TBR e espelho da figura 2.10 (direita). Os valores de suporte de Bremer e de *bootstrap* (valores de GC) estão acima dos ramos. Destaque para clados com Cynodontinae e com Roestinae.

Figura 2.12: Árvore consenso obtida pela análise concatenada dos genes mitocondriais 16S, ATPase e cytb, através do método de máxima parcimônia com TBR.

Figura 2.13: Árvore consenso obtida pela análise concatenada dos genes nucleares myh6, rag2 e do íntron da RPS7, através do método de máxima parcimônia com TBR. Destaque para clados comentados no texto.

Figura 2.14: Árvore consenso obtida pela análise concatenada dos genes nucleares myh6 e rag2, através do método de máxima parcimônia com TBR. Destaque para clados comentados no texto.

Figura 2.15: Árvore consenso obtida pela análise concatenada dos genes 16S, ATPase e do íntron da RPS7, através do método de máxima parcimônia com TBR. Destaque para clados de Cynodontinae e Roestinae.

Figura 2.16: Árvores consenso obtidas pela análise dos genes 16S e ATPase, através do método de máxima parcimônia com TBR.

Figura 2.18: Árvores consenso obtidas pela análise do íntron da RPS7, através do método de máxima parcimônia com TBR.

Tabela 2.1: Sequências utilizadas na análise filogenética. Nova = sequências obtidas no presente estudo, e em vermelho, sequências ou exemplares retirados da análise total.

Group/species	espécime	16S	ATPase	S7	CytB	Myh6	Rag2
Acestrorhynchidae							
<i>Acestrorhynchus altus</i>	22	FJ362536	FJ468299	FJ409848			
<i>Acestrorhynchus britskii</i>		FJ362538	FJ468301	FJ409849			
<i>Acestrorhynchus nasutus</i>		FJ362549	FJ468314	FJ409862			
<i>Acestrorhynchus cf. nasutus</i>	LBP 7035					HQ289087	
<i>Acestrorhynchus falcatus</i>	1	FJ362534	FJ468297	FJ409846			
<i>Acestrorhynchus falcatus</i>	7	FJ362539		FJ409850			
<i>Acestrorhynchus falcatus</i>	2		FJ468302				
<i>Acestrorhynchus falcatus</i>	LBP 4191	HQ171312				HQ289022	
<i>Acestrorhynchus lacustris</i>	LBP 2158	HQ171250				HQ288960	
<i>Acestrorhynchus lacustris</i>	21	FJ362545	FJ468309	FJ409857			
<i>Acestrorhynchus lacustris</i>	20	FJ362545	FJ468308	FJ409856			
<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i>	LBP 3755	HQ171288				HQ288998	
<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i>	8	FJ362550	FJ468315	FJ409863			
<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i>	9	FJ362551		FJ409864			
<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i>	2	FJ362535	FJ468298	FJ409847			
<i>Acestrorhynchus sp.</i>	DC-2004	AY787956			AY791353		AY804026
<i>Acestrorhynchus sp.</i>	JA-2011				JF800994	JF801097	
Alestidae							
<i>Alestes baremoze.</i>	AMNH 226451	AY787963			AY791360		AY804029
<i>Alestes macrophthalmus.</i>		AY787964					AY804030
<i>Alestes macrophthalmus.</i>		AY130841					
<i>Alestes macrophthalmus.</i>	CU 91702				JF801027		
<i>Alestes sp.</i>	LBP 7530	HQ171390				HQ289098	
<i>Alestes sp.</i>		nova	nova				
<i>Arnoldichthys spilopterus</i>	AMNH233399	AY787968			AY791364		AY804032
<i>Arnoldichthys spilopterus</i>	AMCC102151				JF800993	JF801040	
<i>Arnoldichthys spilopterus</i>		nova	nova	nova			
<i>Brycinus nurse</i>	AMNH233415	AY787970			AY791366		AY804034
<i>Brycinus nurse</i>	AMCC 116712				JF801010	JF801055	
<i>Brycinus nurse</i>		nova					
<i>Phenacogrammus interruptus</i>	LBP 2637	HQ171263				HQ288973	
<i>Phenacogrammus interruptus</i>	AMNH233442	AY788052			AY791421	JF801068	AY804102
<i>Phenacogrammus interruptus</i>	AMNH233444						AY804116
<i>Phenacogrammus interruptus</i>		nova	nova				
Characidae/Agoniatinae							
<i>Agoniates anchovia</i>	LBP 6740	HQ171378				HQ289086	
<i>Agoniates anchovia</i>		nova	nova	nova			
<i>Agoniates halecinus</i>	LBP 5503	HQ171342				HQ289051	
Characidae/Aphyocharacinae							
<i>Aphyocharax alburnus</i>	LBP 1587	HQ171242				HQ288952	
<i>Aphyocharax anisitsi</i>	LBP 3764	HQ171292				HQ289002	
<i>Aphyocharax anisitsi</i>	UFRGS:9360	HM562754					
<i>Aphyocharax anisitsi</i>	UFRGS:9361	HM562755					
<i>Aphyocharax anisitsi</i>	RJ DNA-8	FJ749014					
<i>Aphyocharax avary</i>		nova		nova			
<i>Aphyocharax pusillus</i>	LBP 4046	HQ171301				HQ289011	
Characidae/Bryconinae							
<i>Brycon amazonicus</i>	LBP 2187	HQ171251				HQ288961	
<i>Brycon amazonicus</i>		FJ944718					
<i>Brycon amazonicus</i>		DQ530607					
<i>Brycon amazonicus</i>		nova	nova	nova			
<i>Brycon hilarii</i>		AY787976			AY791370		AY804040
<i>Brycon insignis</i>	LBP 2369						
<i>Brycon sp.</i>	JA-2011				JF800992	JF801087	
<i>Brycon sp.</i>	DC-2004						AY804046

Continuação da tabela 2.1: Sequências utilizadas na análise filogenética.

Group/species	espécime	16S	ATPase	S7	CytB	Myh6	Rag2
Characidae/Characinae							
<i>Charax leticiae</i>	LBP 1480	HQ171244			GQ339549	HQ288954	GQ339506
<i>Charax sp.</i>		nova	nova	nova			
<i>Cynopotamus kincaidi</i>	LBP 3225	HQ171271				HQ288981	
<i>Cynopotamus venezuelae</i>	LBP 6132	HQ171359				HQ289068	
<i>Cynopotamus sp.</i>		nova	nova	nova			
<i>Galeocharax knerii</i>	MCP 28907	FJ749024					FJ749115
<i>Galeocharax sp.</i>		nova	nova	nova			
<i>Phenacogaster calverti</i>	LBP 5582	HQ171347				HQ289056	
<i>Phenacogaster calverti</i>	MCP 30683	FJ749034					FJ749120
<i>Phenacogaster sp.</i>		nova		nova			
<i>Priocharax sp.</i>		nova	nova	nova			
<i>Roeboides guatemalensis</i>	LBP 2755	HQ171267				HQ288977	HQ289364
<i>Roeboides guatemalensis</i>			AF040517				
<i>Roeboides guatemalensis</i>			AF040515				
<i>Roeboides myersii</i>		FJ944733					
<i>Roeboides myersii</i>		nova	nova	nova			
<i>Roeboides salvadoris</i>		FJ439411			FJ439180		
<i>Roeboides thurni</i>		nova	nova	nova			
<i>Roeboides sp.</i>	AMNH233430	AY787994			AY791381		AY804056
<i>Roeboides sp.</i>	DC-2004		FJ468318	FJ409865			
Characidae/Cheirodontinae							
<i>Cheirodon australe</i>	LBP 3115	HQ171275				HQ288985	
<i>Cheirodon ibicuiensis</i>	LBP 4777	HQ171334				HQ289043	
<i>Cheirodon sp.</i>	AMNH233214	AY787995			AY791382		AY804057
<i>Cheirodon sp.</i>		nova	nova	nova			
Characidae/Heterocharacinae							
<i>Gnathocharax steindachneri</i>	LBP 4496	HQ171325				HQ289034	
<i>Gnathocharax steindachneri</i>		nova	nova	nova			
<i>Heterocharax macrolepis</i>	LBP 4494	HQ171323				HQ289032	
<i>Heterocharax sp.</i>		nova		nova			
<i>Hoplocharax goethei</i>	LBP 4495	HQ171324				HQ289033	
<i>Hoplocharax goethei</i>		nova	nova	nova			
<i>Loncogenys ilisha</i>		nova	nova	nova			
Characidae/incertae sedis							
<i>Bryconamericus diaphanus</i>	AMNH233340	AY787984			AY791375		AY804048
<i>Bryconamericus emperador</i>	LBP 2754	HQ171266				HQ288976	
<i>Bryconamericus emperador</i>	stri-3911		AF412622				
<i>Bryconamericus exodon</i>	LBP 7123	HQ171380				HQ289088	
<i>Bryconamericus iheringii</i>	UFRGS 10002	FJ749000					FJ749114
<i>Bryconamericus patriciae</i>	UFRGS 8205	FJ748988					FJ749111
<i>Bryconamericus stramineus</i>	UFRGS 10009	FJ748986					FJ749109
<i>Bryconamericus sp.</i>		nova	nova	nova			
<i>Bryconops affinis</i>	LBP 262	HQ171415				HQ289123	
<i>Bryconops sp.</i>	DC-2004	AY787985			AY791376		AY804049
<i>Bryconops sp.</i>		nova	nova	nova			
<i>Exodon paradoxus</i>	LBP 4006	HQ171306				HQ289016	
<i>Exodon paradoxus</i>	AMNH233426	AY788013			AY791397		AY804072
<i>Exodon paradoxus</i>		nova	nova	nova			
<i>Salminus brasiliensis</i>	LBP 850	HQ171437				HQ289145	
<i>Salminus franciscanus</i>	LBP 8090	HQ171401				HQ289109	
<i>Salminus maxillosus</i>		AY788080			AY791438		AY804124
<i>Salminus sp.</i>		nova	nova	nova			

Continuação da tabela 2.1: Sequências utilizadas na análise filogenética.

Group/species	espécime	16S	ATPase	S7	CytB	Myh6	Rag2
Characidae/Tripottheinae							
<i>Tripottheus albus</i>		FJ944736					
<i>Tripottheus angulatus</i>		FJ944737					
<i>Tripottheus angulatus</i>	AMNH233403	AY788082					AY804125
<i>Tripottheus magdalenae</i>		FJ944738					
<i>Tripottheus nematurus</i>	LBP 39-3503	HQ171383				HQ289091	
<i>Tripottheus orinocensis</i>	LBP 2663	HQ171253			GQ339542	HQ288963	GQ339508
<i>Tripottheus pantanensis</i>	LBP 39-3501	GQ368200			GQ339541		GQ339526
<i>Tripottheus sp.</i>		nova	nova	nova			
Crenuchidae							
<i>Characidium fasciatum</i>	AMNH233251	AY787992			AY791380		AY804055
<i>Characidium fasciatum</i>	AMNH233235						AY804054
<i>Characidium laterale</i>	LBP 7614	HQ171398				HQ289106	
<i>Characidium pterostictum</i>	LBP 2132	HQ171284				HQ288994	
<i>Characidium purpuratum</i>	AMNH233314	AY787988					AY804052
<i>Characidium vidali</i>	MNRJ12838	AY788003			AY791388		
<i>Characidium vidali</i>		nova	nova	nova			
Ctenoluciidae							
<i>Boulengerella lateristriga</i>	LBP 7094	HQ171382				HQ289090	
<i>Boulengerella maculata</i>	LBP 3996	HQ171307				HQ289017	
<i>Boulengerella maculata</i>	LBP 4241	HQ171298				HQ289008	
<i>Boulengerella maculata</i>		FJ944739					
<i>Boulengerella maculata</i>		nova	nova	nova			
<i>Boulengerella sp.</i>		nova	nova	nova			
Cynodontidae/Cynodontinae							
<i>Cynodon gibbus</i>	LBP 1619	HQ171241				HQ288951	
<i>Cynodon gibbus</i>		nova	nova	nova			
<i>Cynodon meionactis</i>		nova	nova	nova			
<i>Hydrolycus armatus</i>		nova	nova	nova			
<i>Hydrolycus tatauaia</i>		nova	nova	nova			
<i>Hydrolycus wallacei</i>		nova	nova	nova			
<i>Hydrolycus scomberoides</i>	LBP 3031	HQ171269				HQ288979	
<i>Hydrolycus scomberoides</i>		AY788033					AY804088
<i>Hydrolycus scomberoides</i>		nova	nova	nova			
<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	LBP 4064					HQ289013	
<i>Rhaphiodon vulpinus</i>		nova	nova	nova			
Cynodontidae/Roestinae							
<i>Gilbertolus maracaiboensis</i>	LBP 6107	HQ171362				HQ289070	
<i>Gilbertolus maracaiboensis</i>		nova	nova	nova			
<i>Roestes itupiranga</i>		nova	nova	nova			
<i>Roestes ogilviei</i>	LBP 8157	HQ171410				HQ289118	
<i>Roestes molossus</i>		nova	nova	nova			
<i>Roestes ogilviei</i>		nova	nova	nova			
Distichodontidae							
<i>Distichodus decemmaculatus.</i>	AMNH233392	AY788005			AY791390		AY804065
<i>Distichodus decemmaculatus.</i>		nova	nova				
<i>Distichodus sp.</i>	LBP 7526	HQ171385				HQ289093	
<i>Distichodus sp.</i>	LBP 7526	HQ171386				HQ289094	
<i>Distichodus fasciolatus.</i>	RUSI 065159	AY788007					AY804067
<i>Distichodus fasciolatus.</i>	AMNH 233624	AY788008			AY791393		
<i>Distichodus fasciolatus.</i>	AMNH 240041				JF801034	JF801093	
<i>Distichodus kolleri.</i>	AMNH 249814				JF801033	JF801092	
<i>Distichodus notospilus.</i>	AMNH 231537	AY788010			AY791395		AY804069
<i>Xenocharax spilurus</i>		AY788085			AY791441		
<i>Xenocharax spilurus</i>	AMNH 231548	AY788084			AY791440		
<i>Xenocharax spilurus</i>		Nova	nova				

Continuação da tabela 2.1: Sequências utilizadas na análise filogenética.

Group/species	espécime	16S	ATPase	S7	CytB	Myh6	Rag2
Erythrinidae							
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	LBP 8025	HQ171408				HQ289116	
<i>Hoplerythrinus sp.</i>		nova	nova	nova			
<i>Hoplias aimara</i>	LBP 7837	HQ171396				HQ289104	
<i>Hoplias malabaricus</i>	LBP 5539	HQ171346				HQ289055	
<i>Hoplias malabaricus</i>	AMCC 110702				JF801035	JF801077	
<i>Hoplias malabaricus</i>	OH03		GQ848641				
<i>Hoplias malabaricus</i>	MN04		GQ848639				
<i>Hoplias microlepis</i>	LBP 2763	HQ171264				HQ288974	
<i>Hoplias sp.</i>	DC-2004	AY788031			AY791409		AY804087
<i>Hoplias sp.</i>		nova	nova	nova			
Hemiodontidae							
<i>Hemiodus gracilis</i>	AMNH233427	AY788027			AY791405		AY804084
<i>Hemiodus gracilis</i>		nova	nova	nova			
<i>Hemiodus immaculatus</i>	LBP1725	HQ171246				HQ288956	
Lebiasinidae							
<i>Copella nattereri</i>	LBP 4377	HQ171431				HQ289027	
<i>Copella nattereri</i>	LBP 536	HQ171318				HQ289139	
<i>Copella nattereri</i>		nova	nova	nova			
<i>Nannostomus beckfordi</i>		nova	nova	nova			
<i>Nannostomus espeii</i>		nova	nova	nova			
Parodontidae							
<i>Parodon nasus</i>	LBP 1135	HQ171429				HQ289137	
<i>Parodon sp.</i>	AMNH233323	AY788065			AY791427		AY804110
<i>Parodon sp.</i>		nova	nova	nova			
Prochilodontidae							
<i>Prochilodus lineatus</i>	PRliARsg1		AF281839				
<i>Prochilodus lineatus</i>	PRliARgu1		AF281837				
<i>Prochilodus lineatus</i>	PRliPAas1		AF281833				
<i>Prochilodus lineatus</i>	Hs5			HQ129126		HQ129012	
<i>Prochilodus lineatus</i>	F10			HQ129124		HQ129010	
<i>Prochilodus lineatus</i>							AY804117
<i>Prochilodus lineatus</i>		nova	nova				
<i>Prochilodus nigricans</i>	AMNH233305	AY788075			AY791437		AY804120
<i>Prochilodus nigricans</i>	PN170			HQ129132		HQ129018	
<i>Prochilodus nigricans</i>	PN132			HQ129130		HQ129016	
<i>Prochilodus nigricans</i>		nova	nova	nova			
<i>Prochilodus reticulatus</i>	LBP 6127	HQ171358				HQ289067	
<i>Prochilodus reticulatus</i>	PR29543		HQ129828				
<i>Prochilodus reticulatus</i>	PR29538		HQ129826				
<i>Prochilodus reticulatus</i>	PR29539		HQ129827	HQ129148		HQ129034	
Serrasalminidae							
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	LBP 4255					HQ289024	
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	CEPTA001				HQ420848		HQ420863
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	CEPTA003				HQ420850		HQ420865
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	CEPTA002				HQ420849		HQ420864
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	CEPTA004				HQ420851		HQ420866
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	CEPTA005				HQ420852		HQ420867
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	LBP 4255				AY791435		AY804118
<i>Piaractus mesopotamicus</i>		nova	nova	nova			
<i>Serrasalmus maculatus</i>	LBP 3698	HQ171285				HQ288995	
<i>Serrasalmus sp.</i>	DC-2004	AY788079					AY804123
<i>Serrasalmus spilopleura</i>	LBP 3499	HQ171281				HQ288991	
<i>Serrasalmus sp.</i>		nova	nova	nova			

Tabela 2.2: Exemplares de Cynodontidae (*sensu* Lucena e Menezes, 1998) utilizados na obtenção de novas sequências para a análise filogenética. NC = Não catalogado, N = número de exemplares utilizados.

Subfamília	Espécie	Localidade	Coordenada	Data	Voucher	N
Cynodontinae	<i>Cynodon gibbus</i>	Rio Branco, Mucajaí, RR	01°55'N, 61°00'W	24/01/2009	LIUSP-NC	1
		Rio Araguaia, Barra do Garças, MT	15°53'S, 52°15'W	10/02/2002	LIUSP-NC	1
	<i>Cynodon meionactis</i>	Rio Litanie, Sipalawini, Suriname	03°17'N, 54°04'W	21/04/2007	ANSP 189129 e NC FMNH	2
	<i>Hydrolycus armatus</i>	Rio Culuene, Campinápolis, MT	13°49'S, 53°15'W	19/5/2007	NC MZUSP	1
		Rio Branco, Mucajaí, RR	01°55'N, 61°00'W	24/01/2009	LIUSP-NC	1
	<i>Hydrolycus scomberoides</i>	Rio Solimões, Catalão, AM	03°09.7'S, 59°54.4'W	17/06/2008	LIUSP-NC	1
		Rio Branco, Mucajaí, RR	01°55'N, 61°00'W	24/01/2009	LIUSP-NC	1
	<i>Hydrolycus tatauaia</i>	Rio Culuene, Gaúcha do Norte, MT	13°30'S 53°05'W	24/5/2007	MZUSP 94086	2
		Igarapé Daraqua, Rio Itua, Barcelos, AM	00°29'S, 63°12'W	07/01/2010	LIUSP-NC	2
	<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	Rio Solimões, Careiro, AM	03°10.7'S, 59°52.4'W	17/06/2008	LIUSP-NC	1
		Rio Paraná, Jupia, SP	20°47.9'S, 51°37.9'W	12/05/2007	LIUSP-NC	1
Roestinae	<i>Gilbertolus maracaiboensis</i>	Rio Santa Rosa, Zulia/Venezuela	09°38'N, 72°34'W	26/04/2008	NC	2
	<i>Roestes ogilviei</i>	Rio Branco, Mucajaí, RR	02°00'N, 61°02'W	24/01/2009	LIUSP-NC	1
	<i>Roestes itupiranga</i>	Rio Tapirapé, Rio Tocantins, PA	-	04/08/2008	MZUSP?	1
	<i>Roestes molossus</i>	Rio Karipuna, Rio Madeira, RO	09°11'S, 64°37'W	13/06/2004	NC	2

Tabela 2.3: Exemplos de outros Characiformes (exceto Characidae) utilizados na obtenção de novas sequências para a análise filogenética. NC = Não catalogado, N = número de exemplares utilizados.

Família	Espécie	Localidade	Coordenada	Data	Voucher	N
Distichodontidae	<i>Distichodus decemmaculatus</i>	Importado da África	-	11/10/2002	AMNH233392	1
	<i>Xenocharax spilurus</i>	-	-	-	NC	1
Alestidae	<i>Alestes baremoze</i>	Rio Niger, Benim	11°52' N, 03°23' E	13/11/2000	AMNH 226451	1
	<i>Arnoldichthys spilopterus</i>	Rio Ogun, baixo Rio Niger	-	14/01/2002	AMNH233399	1
Crenuchidae	<i>Characidium vidali</i>	Rio Soberbo, Teresópolis, RJ	22°30' S, 42°59' W	31/10/1993	MNRJ12838	1
Hemiodontidae	<i>Hemiodus gracilis</i>	Importado da América do Sul	-	-	AMNH233427	1
Erytrinae	<i>Hoplias</i>	-	-	-	NC	1
Lebiasinidae	<i>Nannostomus espei</i>	Importado da América do Sul	-	06/05/2002	AMNH233407	1
	<i>Nannostomus beckfordi</i>	Importado da América do Sul	-	06/05/2002	AMNH233406	1
Parodontidae	<i>Parodon</i>	Parque Nac. Amboro, Ichilo, Santa Cruz, BOL	17°34' S, 63°44' W	27/10/2001	AMNH233323	1
Serrasalminae	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Rio Paraguai, MS	-	-	LIUSP-NC	2
	<i>Serrasalmus rhombeus</i>	Igarapé Pacaás Nova, Rio Madeira, RO	10°51'S, 65°16'W	06/07/2009	UNIR 2023	2
Prochilodontidae	<i>Prochilodus nigricans</i>	Parque Nac. Amboro, Ichilo, Santa Cruz, BOL	17°34' S, 63°44' W	26/10/2001	AMNH233305	1

Tabela 2.4: Exemplos de Characidae utilizados na obtenção de novas sequências para a análise filogenética. NC = Não catalogado, N = número de exemplares utilizados e (-) = *Incertae sedis*.

Subfamília	Espécie	Localidade	Coordenada	Data	Voucher	N
Acestrorhynchinae	<i>Acestrorhynchus altus</i>	Cachoeira do Arará, Ilha do Marajó, PA	01°01' S, 48°57' W	-	MZUSP94456	1
	<i>Acestrorhynchus britskii</i>	Represa de Três Marias, Três Marias, MG	18°11'S, 45°18'W	-	MZUSP94465	1
	<i>Acestrorhynchus nasutus</i>	Igarapé lá mirim, São Gabriel da Cachoeira, AM	0°23' N, 66°37' W	-	MZUSP94454	1
Agoniatinae	<i>Agoniatos anchovia</i>	Rio Madeira, Fortaleza do Abunã, RO	10°00'S, 65°18'W	05/11/2009	LIUSP-NC	1
	<i>Agoniatos anchovia</i>	Igarapé Sotério, Rio Madeira, RO	11°36'S, 65°13'W	29/09/2009	LIUSP-NC	1
Bryconinae	<i>Brycon amazonicus</i>	Igarapé Arara, Rio Madeira, RO	10°00'S, 65°18'W	04/06/2009	UNIR NR1779	2
	<i>Triporteus</i>	Rio Solimões, Catalão, AM	03°09.7'S, 59°54.5'W	16/06/2008	LIUSP-NC	2
Characinae	<i>Charax caudimaculatus</i>	Igarapé Jatuarana, Rio Madeira, RO	08°50'S, 64°02'W	08/11/2009	UNIR NR16822	2
	<i>Charax sp.</i>	Igarapé Jaciparaná, Rio Madeira, RO	09°27'S, 64°24'W	08/11/2009	UNIR NR16824	2
	<i>Cynopotamus</i>	Rio Branco, Mucajaí, RR	01°55'N, 61°00'W	24/01/2009	LIUSP-NC	2
	<i>Exodon paradoxus</i>	Importado da América do Sul	-	-	AMNH233426	1
	<i>Galeocharax</i>	-	-	-	NC	2
	<i>Roeboides myersi</i>	Igarapé Belmont, Rio Madeira, RO	08°38'S, 63°50'W	17/06/2004	NC	1
	<i>Roeboides thurni</i>	Rio Mutumparaná, Rio Madeira, RO	09°21'S, 64°50'W	17/06/2004	NC	1
	<i>Cheirodon</i>	Parque Nac. Amboro, Ichilo, Santa Cruz, BOL	17°34' S, 63°44' W	24/10/2001	AMNH233214	1
Heterocharacinae	<i>Gnathocharax steindachneri</i>	Adquirido em lojas especializadas de aquarofilia	-	07/02/2003	NC	1
	<i>Heterocharax</i>	-	-	-	NC	1
Salmininae	<i>Salminus maxillosus</i>	-	-	-	NC	1
-	<i>Bryconamericus sp.</i>	Rio Mairana, Florida, Santa Cruz, BOL	17°51' S, 64°01' W	30/10/2001	AMNH233340	1
-	<i>Bryconops sp.</i>	-	-	-	NC	1

Tabela 2.5: *Primers* utilizados na obtenção de novas sequências para a análise filogenética.

Região	Primer	Autores
S7	S7 1F – 5' TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC 3'	Chow & Hazama, 1998
	S7 2R – 5' AACTCGTCTGGCTTTTCGCC 3'	
ATPase	ATP8 – 5' AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC 3' CO3 – 5' GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC 3'	Sivasundar <i>et al.</i> , 2001
16S	16S ar – 5' ACGCCTGTTTATCAAAAACAT 3' 16S br – 5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'	Kocher et al. 1989; Palumbi, 1996

Tabela 2.6: Reação e ciclos da PCR.

Região	Reação	Ciclos
S7 e ATPase	0,2 mM de dNTPs, 1x de tampão contendo HCl, 0,4 pM de cada um dos primers, 0,7 mM de MgCl ₂ , 0,2 unidade de <i>Taq</i> DNA polimerase (Fermentas) e de 60 a 150 ng de DNA.	94 °C por 3' (94 °C por 30", 60 °C por 45" e 72 °C por 1') ₃₅ e 72 °C por 10'
16S	0,2 mM de dNTPs, 1x de tampão contendo HCl, 0,4 pM de cada um dos primers, 0,7 mM de MgCl ₂ , 0,2 unidade de <i>Taq</i> DNA polimerase (Fermentas) e de 60 a 150 ng de DNA .	95 °C por 10' (95 °C por 50 ", 48 °C por 50" e 72 °C por 1') ₃₅ e 72 °C por 7'

Tabela 2.7: Táxons e regiões gênicas (+) utilizadas na análise filogenética concatenada.

Família	Sub família	Espécies	16S	ATPase	S7	CytB	Myh6	Rag2
Acestrorhynchidae		<i>Acestrorhynchus sp.</i>	+	+	+	+	+	+
Alestidae		<i>Alestes sp.</i>	+	+		+	+	+
		<i>Arnoldichthys spilopterus</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>Brycinus nurse</i>	+			+	+	+
		<i>Phenacogrammus interruptus</i>	+	+		+	+	+
Characidae	Agoniatinae	<i>Agoniatas sp.</i>	+	+	+		+	
	Aphyocharacinae	<i>Aphyocharax sp.</i>	+		+		+	
	Bryconinae	<i>Brycon sp.</i>	+	+	+	+	+	+
	Characinae	<i>Charax sp.</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>Cynopotamus sp.</i>	+	+	+		+	
		<i>Galeocharax sp.</i>	+	+	+			+
		<i>Phenacogaster sp.</i>	+		+		+	+
		<i>Priocharax sp.</i>	+	+	+			
		<i>Roeboides sp.</i>	+	+	+	+	+	+
	Cheirodontinae	<i>Cheirodon sp.</i>	+	+	+	+	+	+
	Heterocharacinae	<i>Gnathocharax steindachneri</i>	+	+	+		+	
		<i>Heterocharax sp.</i>	+		+		+	
		<i>Hoplocharax goethei</i>	+	+	+		+	
		<i>Loncogenys ilisha</i>	+	+	+			
	<i>incertae sedis</i>	<i>Bryconamericus sp.</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>Bryconops sp.</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>Exodon paradoxus</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>Salminus sp.</i>	+	+	+	+	+	+
	Tripottheinae	<i>Tripottheus sp.</i>	+	+	+	+	+	+
Crenuchidae		<i>Characidium sp.</i>	+	+	+	+	+	+
Ctenoluciidae		<i>Boulengerella sp.</i>	+	+	+		+	
Cynodontidae	Cynodontinae	<i>Cynodon sp.</i>	+	+	+		+	
		<i>Hydrolycus sp.</i>	+	+	+		+	+
		<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	+	+	+		+	
	Roestinae	<i>Gilbertolus maracaiboensis</i>	+	+	+		+	
		<i>Roestes sp.</i>	+	+	+		+	
Distichodontidae		<i>Distichodus sp.</i>	+	+		+	+	+
		<i>Xenocharax spilurus</i>	+	+		+		
Erythrinidae		<i>Hoplerethrinus sp.</i>	+	+	+		+	
		<i>Hoplias sp.</i>	+	+	+	+	+	+
Hemiodontidae		<i>Hemiodus sp.</i>	+	+	+	+	+	+
Lebiasinidae		<i>Copella nattereri</i>	+	+	+		+	
		<i>Nannostomus sp.</i>	+	+	+			
Parodontidae		<i>Parodon sp.</i>	+	+	+	+	+	+
Prochilodontidae		<i>Prochilodus sp.</i>	+	+	+	+	+	+
Serrasalminidae		<i>Piaractus mesopotamicus</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>Serrasalmus sp.</i>	+	+	+		+	+

Capítulo 3 – Estrutura populacional e variabilidade genética de *Rhaphiodon vulpinus* (Characiformes) inferidas pelo sequenciamento da região da ATPase do mtDNA

Introdução

Rhaphiodon vulpinus (Cynodontinae) é uma espécie piscívora que habita tanto reservatórios quanto rios de águas correntes (Agostinho *et al.*, 2003), especialmente em águas claras onde sua abundância é maior devido à transparência (Melo *et al.*, 2009). A espécie pode alcançar mais de 70 cm e realiza migrações entre outubro e janeiro com pico de atividade em novembro (Neuberger *et al.*, 2007) quando os ovários representam mais de 15 % do peso corporal (Suzuki, 1992), e contém uma média de 98.185 oócitos com média de 0,98 mm de diâmetro (Neuberger *et al.*, 2007). Embora não existam estudos migratórios específicos para *R. vulpinus*, Agostinho *et al.* (2003) relatam que esta espécie como fracamente migradora por ter sido observada subindo as escadas para transposição de peixes de Itaipu. Além da migração, outros fatores importantes para a estrutura de populações são: a fragmentação do hábitat; a distância geográfica entre subpopulações; eventos demográficos que rompem o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética; e características comportamentais, como a filopatria (Avice, 1994).

Rhaphiodon vulpinus é encontrada nas bacias dos rios Amazonas, Tocantins, Capim, Orinoco, Rupununi, Paraná-Paraguai e Uruguai (Toledo-Piza, 2000), apresentando, desta forma, uma ampla distribuição (naturalmente fragmentada) que se sobrepõe a algumas áreas de refúgio aquático propostas por Hubert & Renno (2006) (figura 3.1). Segundo os autores, tais áreas são o resultado da interação dos processos de incursão marinha, soerguimento dos Andes e conexões históricas que permitiram a dispersão entre drenagens.

O fluxo gênico exerce uma grande importância na caracterização da estrutura populacional de uma espécie, pois determina até que ponto uma população pode ser considerada uma unidade evolutiva independente (Slatkin, 1993). Ou seja, o fluxo gênico intenso homogeneíza as frequências alélicas enquanto o fluxo gênico restrito ou ausente pode fazer com que cada população evolua de modo independente.

Tendo em vista que populações restritas estão mais suscetíveis aos efeitos da deriva, estudos sobre a estrutura populacional e variabilidade genética podem ajudar a formular planos que visem à conservação de ambientes ameaçados. Segundo Agostinho *et al.* (2005) as razões para o declínio da biodiversidade nas águas continentais brasileiras incluem poluição e eutrofização, sedimentação, represas e controle de inundações, pesca e introdução de espécies; sendo estes problemas mais comuns em regiões mais desenvolvidas, como a região das bacias do Paraná-Paraguai e do Uruguai. Dessa forma, o ambiente natural acaba sendo fragmentado, intercalando áreas favoráveis com áreas desfavoráveis.

A identificação de unidades taxonômicas adequadas para a proteção da diversidade biológica é essencial para a conservação. Nesse contexto, um ramo importante da biologia da conservação é a conservação genética, que investiga a variabilidade genética de populações ou espécies no contexto temporal e/ou espacial. Pesquisas em genética de populações são de fundamental importância na elaboração de projetos visando à conservação de recursos naturais, especialmente pelo papel desempenhado pelas variações do genoma em resposta às mudanças ambientais (Marques, 2002). O objetivo principal de programas de manejo e monitoramento genético em peixes tem sido o de contribuir para a conservação do potencial biológico de populações selvagens cujo hábitat tenha sido alterado, e que corram, portanto, risco de redução ou até mesmo de extinção (Toledo-Filho *et al.*, 1992).

Para isso, o DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido usado extensivamente como uma ferramenta para inferir o passado evolutivo e demográficos de populações e espécies. A partir de estudos prévios de divergência do mtDNA foi proposto que os conceitos e abordagens filogenéticas poderiam ser aplicados no nível intra-específico, pois as linhagens mtDNA dentro de cada espécie aparecem muitas vezes estruturadas geograficamente (Avise *et al.*, 1987). Desta forma, após alguns testes de divergência, o sequenciamento da região do genoma mitocondrial que codifica para as subunidades 6 e 8 da ATPase foi escolhido para o estudo da variabilidade de *R. vulpinus*.

Objetivo

Investigar a variabilidade genética dentro e entre amostras de *Rhaphiodon vulpinus*, com o intuito de formular hipóteses sobre a estruturação populacional desta espécie.

Material e Métodos

Foram analisados 101 exemplares de *Rhaphiodon vulpinus* de dez localidades distintas (figura 3.2 e tabela 3.1). A amostra do Rio Madeira é a única constituída por exemplares coletados em diversos pontos ao longo da bacia (tabela 3.2), pois é proveniente de coletas para o levantamento da fauna de peixes do Rio Madeira. O projeto está sendo realizado pela Universidade Federal de Rondônia (UNIR) para a empresa Santo Antônio Energia, como parte dos requisitos para a implantação da Usina Hidrelétrica (UHE) Santo Antônio.

O DNA total dos exemplares foi extraído de acordo com o protocolo de extração salina (Aljanabi & Martinez, 1997), a partir de tecidos do fígado, músculo, coração ou nadadeiras, preservados em álcool 96%.

O sequenciamento da região do mtDNA que codifica para as subunidades 6 e 8 da ATPase foi realizado utilizando os *primers* ATP8 (5' AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC 3') e CO3 (5' GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC 3') (Sivasundar *et al.*, 2001). As amplificações foram realizadas utilizando 0,2 mM de dNTPs, 1x de tampão contendo HCl, 0,4 pM de cada um dos *primers*, 0,7 mM de MgCl₂, 0,2 unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) e de 60 a 150 ng de DNA molde. As condições de amplificação foram 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 60° C por 45 segundos e 72° C por 1 minuto, terminando com 10 minutos de alongação à 72 °C.

O DNA amplificado, após visualização em gel de agarose 1%, foi purificado seguindo o protocolo do *Kit* de purificação ChargeSwitch PCR Clean-Up (Invitrogen). A incorporação de bases marcadas, para posterior sequenciamento, também seguiu as indicações do *Kit* Big Dye Sequence Terminator (v. 3.1, Applied Biosystems). As duas cadeias complementares de

DNA foram sequenciadas e editadas com o programa Geneious Pro 5.3.5 (Drummond *et al.*, 2011). A verificação da similaridade com sequências mitocondriais de outros peixes teleósteos foi feita utilizando-se o programa Blastn, disponível no GenBank.

As sequências obtidas foram alinhadas com o algoritmo Muscle (Edgar, 2004) utilizando a configuração padrão do programa Geneious Pro 5.3.5 (Drummond *et al.*, 2011). Após o alinhamento as sequências foram novamente visualizadas e conferidas no programa SeaView 3.1 (Galtier *et al.*, 1996), o qual foi utilizado na geração de um dendrograma com a distância Kimura 2-Parâmetros, a qual foi estimada pelo programa ModelTest v. 3.6 (Posada & Crandall, 1998). Essa abordagem é indicada para dados com diferentes taxas de transição e transversão.

As relações entre os haplótipos também foram inferidas a partir da construção de uma rede de haplótipos, sob o critério de Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999), implementado no programa Network v. 4.5, com valores de épsilon de 0, 10, 20 e 30.

Com o auxílio do programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), foram estimados dois parâmetros de diferenciação genética entre as populações: o Índice de Fixação (F_{ST}) e o Teste Exato de Diferenciação entre populações (Raymond & Rousset, 1995a). Os resultados obtidos foram corrigidos para múltiplas comparações segundo procedimento sequencial de Bonferroni com $\alpha = 0,05$ (Rice, 1989). Os valores linearizados de F_{ST} (Slatkin, 1995) foram utilizados na análise de isolamento por distância (distância genética *versus* geográfica, como Ln da distância em Km) e no teste de Mantel (com 1000 permutações), realizados pelo mesmo programa.

Testes de estruturação populacional foram feitos pela análise hierárquica da variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992), implementada no programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Essa abordagem requer uma hipótese de agrupamento, por isso testamos o agrupamento evidenciado pela rede de haplótipos, sendo assim, três grupos foram gerados: Grupo Amazônia, sem as amostras do Rio Xingu (AM, PU, RO, RR e TBT); Grupo Araguaia/Xingu (GO, MT e PA); e Grupo Paraná (SP e PR). Os componentes da variância genética foram calculados em três níveis hierárquicos (entre

grupos, entre amostras do mesmo grupo, e entre amostras), e a significância desses valores foi testada através de 1023 permutações.

Foram calculados os valores de diversidade haplotípica (h ; Nei, 1987) e nucleotídica (π), os valores de θ , τ e do índice *raggedness* (Hr_i) de Harpending (1994), que indicam se os dados obtidos desviam significativamente do que seria esperado para um modelo de expansão populacional, com o auxílio do programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

Testes estatísticos de neutralidade foram empregados a fim de se detectar se as mutações observadas são seletivamente neutras e/ou indícios de crescimento, declínio ou heterogeneidade das taxas de mutação. Foram inferidos os seguintes testes: D, (Tajima, 1989), que se baseia no modelo de sítios infinitos sem recombinação e compara duas estimativas de theta (θ); e de Fu (F_s) (Fu, 1997), que também se baseia no modelo de sítios infinitos sem recombinação e utiliza-se do número observado de diferenças de pares de base (retirado como uma estimativa de theta). Esse teste é reconhecidamente mais sensível para a detecção de expansão populacional (Fu, 1997; Ramos-Onsins & Rozas, 2002), e possui nível de significância de 5% quando $P = 0,02$. Os testes de neutralidade também foram obtidos com o programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

Resultados

Foram encontrados 15 haplótipos entre os 101 indivíduos analisados (tabela 3.3). Oito haplótipos são restritos a determinada localidade de coleta, enquanto sete haplótipos são compartilhados (tabela 3.4). Os haplótipos mais frequentes são também aqueles compartilhados entre localidades (A, C, E J e M), entretanto esta alta frequência pode ser explicada pela ampla distribuição do haplótipo dentro de uma determinada bacia, com, por exemplo, o haplótipo A (mais frequente na Bacia do Paraná) e o haplótipo C (mais frequente na Bacia Amazônica, exceto Xingu). Os haplótipos J e M apresentam uma distribuição diferenciada já que o haplótipo J é o mais frequente em duas localidades de bacias hidrográficas diferentes (Araguaia e baixo Xingu), além disso, ele também é encontrado no alto Xingu, onde o haplótipo M é o mais

frequente, correspondendo a 84,6% da incidência total desse haplótipo (que também é encontrado no baixo Xingu) (tabela 3.4).

O dendrograma obtido (figura 3.3) evidencia três grupos principais. Embora não correspondam exatamente a uma bacia hidrográfica em particular, os grupos são formados por haplótipos encontrados: na Bacia Amazônica, exceto Rio Xingu, com o haplótipo C (mais interno) relacionado a todos os outros haplótipos; outro por haplótipos restritos as bacias do Xingu e do Araguaia, com o haplótipo D como mais proximamente relacionado; e o terceiro e mais divergente formado por haplótipos encontrados na Bacia do Paraná (compartilhados com o Rio Madeira). As relações entre os haplótipos também foram inferidas pela rede de haplótipos (figura 3.4), que evidencia os mesmos três grupos do dendrograma.

Os parâmetros de diferenciação genética entre as populações (tabela 3.5) evidenciaram uma divergência significativa entre as diferentes bacias analisadas, com exceção das amostras do Rio Xingu que apresentaram diferenciação em relação às outras amostras da Bacia Amazônica. As localidades do Xingu, após a correção de Bonferroni, evidenciam histórias distintas, com o alto Xingu diferenciado de todas as outras localidades, exceto o baixo Xingu. Entretanto a amostra do baixo Xingu também não é significativamente diferente da amostra do Araguaia. Após a correção de Bonferroni, outros valores perderam a significância, entretanto todos estão relacionados à amostra proveniente do Peru, que é composta por quatro indivíduos com dois haplótipos restritos, o que pode ter influenciado no resultado.

O valor de P do teste exato de diferenciação global foi zero o que evidencia estruturação entre as amostras. A estrutura testada na análise hierárquica da variância molecular (AMOVA) apresentou valores significativos para a variância encontrada entre os grupos Amazônia, Araguaia/Xingu e Paraná (tabela 3.6). Resultados significativos também foram encontrados para os outros dois níveis hierárquicos, sendo a maior divergência entre grupos e a menor entre amostras dentro do mesmo grupo.

Rhaphiodon vulpinus apresenta um padrão de isolamento pela distância quando todos os indivíduos são analisados (figura 3.5), com $r = 0,64$ e $p = 0,003$ na correlação de Mantel. Este modelo assume o fluxo gênico local entre

localidades vizinhas numa população de distribuição contínua (Wright, 1943), no entanto vale ressaltar que a Bacia do Paraná está separada da Bacia Amazônica, porém essas bacias possuem áreas históricas de conexão, e por isso a distância geográfica entre as amostras foi estimada através de uma possível conexão via Rio Guaporé com a Bacia do Paraguai. Entretanto, excluindo as amostras da Bacia do Paraná o padrão de isolamento pela distância permanece ($r = 0,52$ e $p = 0,009$ na correlação de Mantel) (figura 3.5).

A tabela 3.7 apresenta índices de diversidade, de parâmetros populacionais e testes de neutralidade para cada localidade amostrada. Foram observados baixos valores de diversidade (h e π) para as amostras da Bacia do Paraná (SP e PR) em relação às outras localidades. A amostra de RO apresentou a maior diversidade nucleotídica (0,48%), provavelmente por apresentar os haplótipos A e B que são bem divergentes dos haplótipos que ocorrem na Bacia Amazônica.

A diferença entre os parâmetros populacionais θ_0 e θ_1 pode indicar expansão populacional, quanto o θ_1 é muito maior do que o θ_0 , o que é observado nas amostras AM, RR, PU e TBT (tabela 3.7). Entretanto os testes de neutralidade realizados não indicaram desvios em relação ao modelo neutralista. O teste F_s apresentou $P = 0,03$ para a amostra de Manaus (AM), entretanto, o manual do Arlequin v. 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) ressalta que o nível de significância de 5% é alcançado quando $P = 0,02$. O índice *raggedness* (H_{ri}) de Harpending (1994), específico na detecção de expansão populacional, também refutou essa hipótese (tabela 3.7). Baseado nos resultados, alguns testes foram refeitos após a delimitação dos grupos genéticos e detectaram uma expansão populacional no oeste da Bacia Amazônica (tabela 3.8),

Discussão

Variabilidade e estruturação populacional

Os resultados obtidos pela rede de haplótipos, pelo dendrograma e pelos sítios polimórficos compartilhados evidenciam a existência de três grupos genéticos distintos, que correspondem quase exatamente à Bacia do Paraná, ao oeste da Amazônia e ao leste da Amazônia (rios Araguaia e Xingu). Os agrupamentos indicados foram testados pela AMOVA, que mostrou que a divergência entre os grupos é a responsável pela maior parte da variação observada em *Rhaphiodon vulpinus*. Os três grupos também foram observados nos testes de diferenciação genética, sendo que o F_{st} indica uma divergência entre a amostra do Araguaia e a amostra do alto Xingu, que estão separadas por uma distância fluvial de mais de 3.400 km..

A distribuição dos haplótipos mostra que apenas dois são compartilhados entre grupos distintos, indicando uma conexão entre a Bacia do Paraná e o Rio Madeira (Bacia Amazônica). Dentro dos grupos obtivemos que os haplótipos mais frequentes são também aqueles compartilhados: com três haplótipos compartilhados entre localidades do grupo do oeste da Amazônia (C, D e E), dois entre as localidades do grupo do leste da Amazônia (J e M) e um entre as localidades da Bacia do Paraná (A).

Os haplótipos compartilhados C e J parecem ser o centro de diversificação dos grupos do oeste da Amazônia e do leste da Amazônia, respectivamente; enquanto que o haplótipo D do grupo do oeste da Amazônia aparece como origem o grupo do leste.

Em relação aos outros haplótipos compartilhados, observamos que o haplótipo M (restrito a Bacia do Xingu) possui uma frequência muito elevada no alto Xingu, o que diminui os índices de diversidade dessa localidade em relação às outras do grupo. Além dele, o haplótipo A está fixado na amostra do alto Paraná (SP) e é o mais abundante também no baixo Paraná (PR). Além disso, a Bacia do Paraná é a que possui o menor número de haplótipos amostrados, com uma média de 1,5 contra 3,6 no oeste da Amazônia e três no leste da Amazônia.

Os haplótipos da Bacia do Paraná diferem entre si por apenas por um sítio polimórfico, enquanto que são seis no leste e 14 no oeste da Amazônia. Entretanto, este alto polimorfismo observado no oeste da Amazônia é o reflexo da presença dos haplótipos A e B (que ocorrem na Bacia do Paraná) em indivíduos do Rio Madeira, já que estes possuem sete sítios polimórficos em relação aos outros haplótipos, o que indica uma conexão entre a sub-bacia do Rio Madeira e a Bacia do Paraná após um período de divergência.

Esta hipótese é reforçada pelos dados de distância e também pela rede de haplótipos, que evidenciam a divergência dos haplótipos A e B em relação aos outros da região Amazônica. Desta forma, pensando nos haplótipos A e B do Rio Madeira como um contato posterior à estruturação, as posições 126, 464, 509, 563, 821 e 840 poderiam ser consideradas como marcadoras de um evento cladístico entre os rios da região Amazônica e da Bacia do Paraná.

Os índices de diversidade genética, independente da magnitude, permitem inferências sobre os processos demográficos que atuaram sobre as populações (Grant & Bowen, 1998). O Rio Madeira, além de ter a maior diversidade nucleotídica (π), apresentou também uma elevada diversidade haplotípica, o que segundo (Grant & Bowen, 1998) pode ser decorrente de estabilidade populacional ou do contato secundário entre linhagens previamente divergentes, que parece ser o caso da amostra RO. Dessa forma, os resultados para a amostra do Rio Madeira devem ser vistos com cautela, já que essa localidade provavelmente recebeu migrantes com haplótipos muito divergentes provenientes da Bacia do Paraná-Paraguai, o que é evidenciado pelos valores elevados de Tau e de π .

Os resultados também apontam para um formato de diversificação em estrela no oeste da Amazônia, o que pode indicar uma expansão populacional ou de habitat. A hipótese de expansão populacional foi refutada nas amostras; entretanto, os testes foram refeitos após a delimitação dos grupos genéticos e detectaram uma expansão populacional no grupo do oeste da Bacia Amazônica, o que já havia sido indicado pela discrepância nos valores de theta 0 e theta 1 nas análises individuais e reforçado pelos os valores obtidos na análise agrupada (Tau, theta 0 e theta 1).

O padrão de diversidade obtido para os grupos mostra valores moderados na Bacia Amazônica e valores muito baixos na Bacia do Paraná.

Graves (1998) relata a variação dos valores de diversidade nucleotídica em populações de peixes marinhos de distribuição descontínua (0,1 a 2,48%) e contínua (0,15 a 0,59%), porém para peixes de água doce não há um trabalho similar. Entretanto, Moysés & Almeida-Toledo (2002) relatam a diversidade no gênero *Astyanax* entre 0,09 e 0,41%, enquanto que Baroni (2011) encontrou valores entre 0,01 e 0,28% para a diversidade nucleotídica e entre 0 e 0,867 para a diversidade haplotípica.

A análise por amostra mostrou que, apesar da similaridade nos valores obtidos de diversidade haplotípica entre o oeste e o leste da Bacia Amazônica, as amostras do oeste possuem uma diversidade individual maior do que as amostras do leste, o que evidencia a capacidade de dispersão de *R. vulpinus* entre as localidades da região. Na Bacia do Paraná, detectamos a perda da variabilidade no alto Paraná com a fixação do haplótipo A. Entretanto, a diminuição da variabilidade neste trecho do rio era esperada já que a colonização se deu após a construção da represa de Itaipu em 1983, e por isso a espécie não é encontrada acima das represas construídas antes de 1982.

Além da expansão populacional no oeste da Amazônia, *Rhaphiodon vulpinus* pode ter passado por uma expansão de habitat, já que um padrão de isolamento pela distância é evidenciado não só para a região Amazônica, como também quando todas as localidades são analisadas. Desta forma, os resultados indicam que *R. vulpinus* apresenta grande capacidade migratória com isolamento pela distância; e que a subdivisão populacional parece ser decorrente de eventos históricos e necessita ser melhor investigada.

Considerações sobre a conservação

A descrição da estrutura de populações é um tópico comum na literatura sobre conservação genética, por inferir níveis de fluxo gênico e de diferenciação entre populações, que são utilizados para a determinação de unidades evolutivas distintas para planos de conservação da biodiversidade. Uma Unidade Evolutiva Significativa (UES) pode ser definida como populações que representam variações adaptativas significativas (Allendorf & Luikart, 2006), e que podem ser consideradas como a unidade mínima distinta para programas de conservação (Vogler & Desalle, 1994).

Embora os métodos pelos quais as UESs são definidas sejam ainda foco de discussões (Brower, 1999; Sites & Marshall, 2003), a alta estruturação apresentada por *R. vulpinus* sugere a existência de populações representando UESs distintas (Bacia do Paraná, oeste da Amazônia e leste da Amazônia). Os três agrupamentos obtidos indicam que a heterogeneidade genética da espécie possa estar associada às áreas de refúgio aquático propostas por Hubert & Renno (2006), que resultam da interação dos processos de incursão marinha, soerguimento dos Andes e conexões históricas que permitiram a dispersão entre drenagens.

Hubert & Renno (2006) também relatam que a ictiofauna dos tributários amazônicos que drenam o Escudo Brasileiro é mais similar entre si do que com outras regiões da Bacia Amazônica, o que indica que a história demográfica de diversos peixes pode ser mais antiga do que a formação atual do sistema de drenagem Amazônico, evidenciando a grande plasticidade ontogenética dessas espécies, o que contribuiu para a adaptação em diversos ambientes (Camargo *et al.*, 2004). *R. vulpinus* parece ser um exemplo de história demográfica antiga, já que os dados moleculares obtidos indicam algumas conexões históricas que permitiram a dispersão entre drenagens. Além disso, Hubert & Renno (2006) relatam uma diferenciação preferencialmente leste-oeste na região amazônica, o que pode ter sido ocasionado pela heterogeneidade de ambientes e pela origem recente do sistema de drenagem atual do oeste da Amazônia, o que pode explicar também a expansão populacional observada em *R. vulpinus* desta região.

Dentro de cada uma das três UES encontramos uma baixa divergência para *R. vulpinus*, apesar de as distâncias geográficas variarem de 470 km (entre PU e TBT) a mais de 3.400 km (entre GO e MT), o que indica que essa espécie possui uma grande capacidade migratória na ausência de barreiras física (atuais ou históricas), e por isso deve constar na lista de espécies migradoras dos levantamentos de peixes realizados para os estudos de implantação de barragens para a geração de energia (como as UHE de Jirau e Santo Antônio no Rio Madeira e a UHE de Volta Grande no Xingu).

No presente estudo, não detectamos barreiras dentro de um mesmo rio, tanto no Rio Xingu quanto no Rio Madeira; entretanto, a Cachoeira do Teotônio no Rio Madeira (onde será construída a UHE de Santo Antônio) e a Cachoeira

de Volta Grande no Rio Xingu (onde será construída a UHE de Volta Grande) são barreiras para a dispersão de diversas outras espécies (Abell *et al.*, 2008; Torrente-Vilara *et al.*, 2011). Acreditamos que o uso de um marcador mais variável, como os microssatélites, seja mais apropriado para estudos de estruturação mais elaborados, podendo, inclusive, detectar estruturações regionais mais recentes.

Na Bacia do Paraná encontramos uma baixa diversidade, o que pode ser um indício de gargalo genético. As localidades desta bacia encontram-se em regiões sob forte influência antrópica, com a presença de grandes cidades no entrono e de reservatórios em cascata, diferentemente das áreas de coleta da Amazônia, que constituem áreas mais preservadas. Alterações ambientais podem afetar as condições de vida dos organismos e podem ocasionar redução da diversidade biológica (Britski, 1995). As espécies mais afetadas, segundo Primack *et al.* (2001), incluem aquelas que possuem: distribuições geográficas restritas, populações pequenas, tamanho populacional em declínio, baixa densidade populacional, espécies de grande porte e que requerem uma área extensa para sobreviver, espécies que requerem um nicho especializado, espécies com baixa variabilidade genética, e espécies migradoras.

Rhaphiodon vulpinus é uma espécie predadora que realiza migrações reprodutivas, e por isso a presença de reservatórios em cascata na Bacia do Paraná aliada à baixa variabilidade genética encontrada nessa bacia são fatores que preocupam a manutenção da UES da Bacia do Paraná. Vale ressaltar que há registros em museus de *R. vulpinus* no Rio Uruguai, mas que atualmente essa espécie não é mais coletada neste rio (L.R. Malabarba, comunicação pessoal). Desta forma, o acompanhamento a longo prazo da UES da Bacia do Paraná com marcadores mais variáveis é fundamental para a avaliação da diversidade genética de *R. vulpinus* na região.

Figura 3.1: Distribuição de *R. vulpinus* (Toledo-Piza, 2000) sobreposta sobre os refúgios aquáticos (elipses, I-VIII) propostos por Hubert & Renno (2006), incluindo os paleoarcos (a-f) e rotas de dispersão (setas, 1-7) postuladas pelos autores.

Figura 3.2: Mapa hidrográfico da América do Sul evidenciando as bacias amostradas. Na Bacia Amazônica: 1) PU, 2) TBT, 3) RR, 4) AM, 5) RO, 6) PA e 7) MT (as duas últimas no Rio Xingu); na Bacia do Araguaia/Tocantins: 8) GO; e na Bacia do Paraná: 9) SP e 10) PR.

Figura 3.3: Dendrograma não enraizado obtido pelo algoritmo *Neighbor Joining* a partir das distâncias K2P obtidas para os haplótipos. Em destaque estão os haplótipos restritos aos rios Araguaia/Xingu (acima) e abaixo, destacamos os haplótipos encontrados na bacia do Paraná (compartilhados com o Rio Madeira).

Figura 3.4: Rede de haplótipos obtida pelo algoritmo *median joining*. Grupo 1: haplótipos encontrados na bacia Amazônica, exceto rio Xingu. Grupo 2: haplótipos encontrados nas bacias do Xingu e do Araguaia. Grupo 3: haplótipos encontrados na bacia do Paraná.

Figura 3.5: Relação entre a distância genética (Fst de Slatkin) e o logaritmo natural da distância geográfica (em km) obtidas pela análise da ATPase de *R. vulpinus*. Acima é apresentada a relação entre todas as amostras e abaixo entre as amostras da região Amazônica (i.e. sem SP e PR).

Tabela 3.1: Localidades de coleta e número de indivíduos de *Rhaphiodon vulpinus* analisados (N_{seq}). Para RO, ver tabela 3.2.

Sigla	Bacia	Localidade	Coordenada	Data	N _{seq}
SP	Paraná	Rio Paraná, Jupiá, SP	20°47,97' S 51°37,94' W	12/05/2007	10
PR	Paraná	Rio Paraná, Foz do Iguaçu, PR	24°51,33' S 54°18,47' W	11/01/2011	9
RO	Amazônica	Rio Madeira		05/10/2009	12
AM	Amazônica	Rio Solimões, Careiro, AM	03°10,79' S 59°52,44' W	17/06/2008	10
RR	Amazônica	Rio Branco, Mucajaí, RR	01°55,83' N 61°00,10' W	24/01/2009	10
PU	Amazônica	Rio Itaya, Iquitos, Peru	03°45,59' S 73°15,00' W	17/11/2009	4
TBT	Amazônica	Rio Solimões, Tabatinga, AM	04°19,91' S 69°53,44' W	15/01/2010	10
GO	Araguaia/Tocantins	Rio Araguaia, Aragarças, GO	15°53,27' S 52°01,40' W	13/11/2010	11
MT	Amazônica/Xingu	Rio Culuene, Canarana, MT	13°30,76' S 53°05,80' W	16/11/2010	15
PA	Amazônica/Xingu	Rio Xingu, Vitória do Xingu, PA	02°59,40' S 51°59,40' W	30/11/2010	10

Tabela 3.2: Identificação das localidades de coleta de *R. vulpinus* na bacia do Rio Madeira (amostra RO) analisados (N_{seq}).

localidade	Coordenadas	Posição em relação à Cachoeira do Teotônio	N _{seq}
Igarapé Sotério	11°36'03.3"S, 65°13'44.7"W	Montante	2
Igarapé Mutumparaná	09°36'39.0"S, 64°55'36.8"W	Montante	
Igarapé São Lourenço	09°21'53.3"S, 64°50'54.3"W	Montante	
Igarapé Jatuarana	08°50'07.7"S, 64°02'31"W	Jusante	6
Igarapé Belmont	08°38'27.9"S, 63°50'59.7"W	Jusante	1
Lago Cuniã	08°19'37.1"S, 63°30'28.6"W	Jusante	
Lago Puruzinho	07°22'10.7"S, 63°03'33.2"W	Jusante	
Manicoré	05°50'50.2"S, 61°19'47.5"W	Jusante	1
Aripuanã	05°06'54.6"S, 60°23'24.8"W	Jusante	
Lago Sampaio	03°54'44.5"S, 59°07'50"W	Jusante	2

Tabela 3.3: Haplótipos encontrados na região da ATPase 6/8 de *Rhaphiodon vulpinus*. As posições dos sítos variáveis estão de acordo com o alinhamento pelo muscle das sequências analisadas depositadas no GenBank (nº GB).

Haplótipo	Sítios variáveis																			
	126	264	288	299	380	406	464	500	506	509	563	569	638	650	740	785	800	821	839	840
A	G	T	G	A	A	C	C	T	A	T	A	A	A	A	A	A	G	T	T	T
B	G	T	A	A	A	C	C	T	A	T	A	A	A	A	A	A	G	T	T	T
C	A	T	A	A	A	C	T	T	A	C	G	A	A	A	A	A	G	A	C	C
D	A	T	A	A	A	T	T	T	A	C	G	A	A	A	A	A	G	A	C	C
E	A	T	A	A	A	C	T	T	G	C	G	A	A	A	A	A	G	A	C	C
F	A	T	A	A	A	C	T	T	A	C	G	A	A	A	A	G	G	A	C	C
G	A	T	A	A	A	C	T	C	A	C	G	A	A	A	A	A	G	A	C	C
H	A	T	A	A	A	C	T	T	A	C	G	G	A	A	A	A	G	A	C	C
I	A	T	A	G	A	C	T	T	A	C	G	A	A	A	A	A	G	A	C	C
J	A	T	A	A	A	T	T	T	A	C	G	A	A	A	A	A	G	A	T	C
K	A	T	A	A	A	T	T	T	A	C	G	A	A	G	G	A	A	A	T	C
L	A	T	A	A	G	T	T	T	A	C	G	A	A	A	A	A	G	A	T	C
M	A	T	A	A	A	T	T	T	A	C	G	A	A	G	A	A	A	A	T	C
N	A	T	A	A	A	T	T	T	A	C	G	A	G	G	A	A	A	A	T	C
O	A	C	A	A	A	T	T	T	A	C	G	A	A	A	A	A	G	A	T	C

Tabela 3.4: Frequências absolutas e relativas dos haplótipos encontrados para a região da ATPase 6/8 de *Rhaphiodon vulpinus* em cada localidade amostrada.

Haplótipos	Bacia do Paraná		Bacia Amazônica, exceto Xingu					Bacia do Araguaia	Bacia do Xingu		Total
	SP	PR	RO	AM	RR	TBT	PU	GO	PA	MT	
A	10 (100%)	8 (88,9%)	1 (8,3%)								19
B		1 (11,1%)	3 (25%)								4
C			4 (33,3%)	6 (60%)	6 (60%)	5 (50%)	2 (50%)				23
D			1 (8,3%)	1 (10%)		2 (20%)					4
E			3 (25%)	2 (20%)	4 (40%)	2 (20%)					11
F				1 (10%)							1
G							1 (25%)				1
H							1 (25%)				1
I						1 (10%)					1
J								5 (50%)	7 (63,6%)	3 (20%)	15
K								4 (40%)			4
L								1 (10%)			1
M									2 (18,2%)	11 (73,3%)	13
N										1 (6,7%)	1
O									2 (18,2%)		2
Total	10	9	12	10	10	10	4	10	11	15	101

Tabela 3.5: Valores de Fst (abaixo) e valores de P do teste exato de diferenciação (acima) para a região da ATPase 6/8 de *Rhaphiodon vulpinus*. Em destaque estão os valores significativos, e em negrito estão aqueles valores não significativos após a correção de Bonferroni.

	SP	PR	RO	AM	RR	TBT	PU	GO	PA	MT
SP	-	0,46370	0	0	0	0	0,00165	0	0	0
PR	0,01235	-	0,00195	0	0	0,00010	0,00265	0	0	0
RO	0,52652	0,39428	-	0,44260	0,25980	0,50845	0,18885	0	0	0
AM	0,67778	0,55863	0,01180	-	0,65035	1,00000	0,36685	0	0,00060	0
RR	0,73333	0,61588	0,03056	-0,05159	-	0,43070	0,04120	0	0	0
TBT	0,63333	0,51305	-0,01277	-0,07639	-0,02151	-	0,28795	0,00085	0,00025	0
PU	0,75758	0,57143	0,01075	-0,03524	0,06320	- 0,03438	-	0,00495	0,00310	0,00055
GO	0,67778	0,55863	0,26527	0,35556	0,41111	0,31111	0,28556	-	0,02380	0,00020
PA	0,69757	0,58471	0,29767	0,38769	0,44173	0,34427	0,32917	0,10138	-	0,00555
MT	0,73823	0,64344	0,37749	0,46576	0,51505	0,42560	0,43496	0,40519	0,31014	-

Tabela 3.6: AMOVA obtida para a região da ATPase 6/8 de *Rhaphiodon vulpinus*.

	Varição	g.l.	Componentes da variância	Porcentagem do total	P *	ϕ
3 grupos: Araguaia + Xingu; Amazônica, Paraná	Entre grupos	2	2,31399 Va	75,62	0	0,75616
	Entre amostras do mesmo grupo	7	0,15520 Vb	5,07	0,00098	0,20799
	Entre amostras	91	0,59100 Vc	19,31	0	0,80687

Tabela 3.7: Para cada localidade de coleta são apresentados o número de haplótipos (H) e de sítios polimórficos, os Índices de diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π), em porcentagem (%), os parâmetros populacionais (Tau, Theta0 e Theta1), os testes de neutralidade D e Fs e o índice *raggedness* de Harpending (1994) (Hri) encontrados para a região da ATPase 6/8 de *Rhaphiodon vulpinus*.

	H	Sítios polimórficos	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica (%)	Tau	Theta0	Theta1	Testes de neutralidade		Hri
								D (Tajima)	Fs (Fu)	
SP	1	0	0	0	-	-	-	-	-	-
PR	2	1	0,2222 +/- 0,1662	0,0258 +/- 0,0380	0,294	0	1,874	-1,08823 (P=0,18)	-0,26348 (P= 0,15)	0,35 (P= 0,66)
RO	5	10	0,8182 +/- 0,0703	0,4810 +/- 0,2897	9,191	0,001	5,879	1,02494 (P= 0,88)	1,62758 (P= 0,80)	0,14 (P= 0,28)
AM	4	3	0,6444 +/- 0,1518	0,0875 +/- 0,0792	0,967	0	2382,500	-1,03446 (P= 0,20)	-1,46598 (P= 0,03)	0,22 (P= 0,18)
RR	2	1	0,5333 +/- 0,0947	0,0617 +/- 0,0630	0,831	0	1660,625	1,30268 (P= 0,94)	1,02917 (P= 0,62)	0,28 (P= 0,18)
TBT	4	3	0,7333 +/- 0,1199	0,1056 +/- 0,0900	1,166	0	1622,188	-0,50669 (P= 0,33)	-1,07085 (P= 0,12)	0,26 (P= 0,13)
PU	3	2	0,8333 +/- 0,2224	0,1168 +/- 0,1157	1,280	0	2645,000	-0,70989 (P= 0,28)	-0,88730 (P= 0,11)	0,52 (P= 0,42)

GO	3	4	0,6444 +/- 0,1012	0,2098 +/- 0,1491	3,984	0	3,174	1,04827 (P= 0,86)	1,72621 (P= 0,84)	0,40 (P= 0,10)
PA	3	3	0,5818 +/- 0,1420	0,1154 +/- 0,0951	1,866	0,001	1,768	-0,14180 (P= 0,43)	0,55135 (P= 0,61)	0,06 (P= 0,95)
MT	3	3	0,4476 +/- 0,1345	0,0948 +/- 0,0806	2,846	0,001	0,958	-0,33397 (P= 0,41)	0,50999 (P= 0,58)	0,33 (P= 0,32)

Tabela 3.8: Índices de diversidade (haplotípica e nucleotídica), parâmetros populacionais (Tau, Theta0 e Theta1), testes de neutralidade (D e Fs) e o índice de Harpending (1994) (*Hri*) encontrados para a região da ATPase 6/8 nos grupos genéticos de *Rhaphiodon vulpinus*.

	Paraná	Oeste da Amazônia	Leste da Amazônia
Diversidade haplotípica	0,1053 +/- 0,0920	0,6937 +/- 0,0575	0,6984 +/- 0,0478
Diversidade nucleotídica (%)	0,0122 +/- 0,0238	0,2194 +/- 0,1418	0,1705 +/- 0,1179
Tau	3,000	1,000	2,316
Theta0	0	0	0,002
Theta1	0,125	99999,000	3,611
D (Tajima)	-1,16480 (P=0,14)	-1,26125 (P=0,10)	0,00734 (P=0,51)
Fs (Fu)	-0,83782 (P=0,08)	-1,54721 (P=0,25)	-0,31150 (P=0,44)
<i>Hri</i>	0,63 (P=0,71)	0,13 (P=0,03)	0,08 (P=0,45)

Capítulo 4 – Obtenção e caracterização de locos de microssatélites em *Rhaphiodon vulpinus* (Cynodontidae, Characiformes) e suas aplicações em outras espécies de Cynodontinae

Rhaphiodon vulpinus (Cynodontidae) é uma espécie Neotropical de água doce que apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas bacias do Paraná-Paraguai, Uruguai, Amazonas, Essequibo e Orinoco (Toledo-Piza, 2000), sistemas de drenagem atualmente separados, mas que apresentam conexões históricas. A revisão morfológica realizada por Toledo-Piza (2000) mostrou vários graus de sobreposição em algumas características investigadas, com variações contínuas em toda a área de distribuição da espécie. Devido a esta estabilidade morfológica e a sua distribuição, *R. vulpinus* é uma espécie adequada para estudos genéticos sobre a estrutura populacional, com a possibilidade de entender a formação dos sistemas de drenagens modernos através da história demográfica desta espécie. Marcadores moleculares, como os microssatélites, são muito utilizados e eficientes em investigações de estrutura populacional, devido a sua alta variabilidade, por isso, o nosso objetivo aqui foi o de desenvolver marcadores de microssatélites (*simple sequence repeats* – SSRs) para *R. vulpinus* (subfamília Cynodontinae).

O DNA total foi extraído a partir de tecidos do fígado, músculo, coração ou nadadeiras preservados em álcool 96%, de acordo com o protocolo de extração salina de (Aljanabi & Martinez, 1997). Os marcadores foram isolados a partir de uma biblioteca genômica enriquecida para as repetições (CT)_n e (GT)_n utilizando sequências de oligonucleotídeos marcados com partículas magnéticas com estreptavidina (Sigma Life Science), segundo Kijas *et al.* (1994) com modificações de Billote *et al.* (1999).

Os fragmentos enriquecidos foram ligados no vetor pGEM-T Easy (Promega ou Prodimol Biotecnologia), como descrito pelo fornecedor e o produto foi utilizado para transformar células competentes XL1Blue de *E. coli*. Foram obtidas e sequenciadas 199 colônias recombinantes, utilizando o kit BigDye sequence terminator version 3.1 (Applied Biosystems) e um sequenciador ABI PRISM 3100 DNA Genetic Analyser (Applied Biosystems). O programa *Geneious* Pro 5.3.5 (Drummond *et al.*, 2011), foi utilizado para editar

e alinhar as sequências *forward* and *reverse*, localizar os locos de microsatélites com o *plugin* Phobos (Mayer, 2010) e desenhar os *primers* com o Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Dentre os 82 clones que continham locos de microsatélites, foram desenhados *primers* para 25 locos, sendo que cada *primer forward* foi sintetizado com uma cauda M13 de 18 pb (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') segundo o método de Schuelke (2000) que envolve além dos *primers* loco-específicos *forward* modificado e *reverse*, o *primer* universal M13 marcado com sonda fluorescente (6-FAM ou HEX).

As amplificações foram realizadas utilizando 1 pmol do *primer forward*, 5 pmol do *primer reverse*, 1 pmol do *primer* universal M13, 200 µm dNTPs, 0.5 U Taq polymerase (Fermentas), 2 mm de MgCl₂ e 1x de tampão contendo HCl (ambos Fermentas), 1x de BSA e entre 60 e 150 ng de DNA molde. As condições de amplificação foram 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 48° C por 45 segundos e 72° C por 1 minuto, terminando com 10 minutos de elongação à 72 °C. Os alelos foram visualizados através do programa Gene Marker v. 1.80 (SoftGenetics), após serem genotipados no ABI 3730 DNA Analyzer, com o marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems).

Um total de 59 exemplares de *R. vulpinus* de duas localidades (31 de Manaus e 28 de Tabatinga) foram utilizados para a verificação de polimorfismos, que evidenciou 11 locos polimórficos (entre 3 e 26, com média de 16,1 alelos por loco) de fácil interpretação entre os 22 amplificados. Os valores de heterozigosidade observada e esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Nei, 1978), e os testes do EHW e do desequilíbrio de ligação foram estimadas pelo programa GenePop on the web v. 3.3 (Raymond & Rousset, 1995). O programa Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004) foi utilizado para quantificar erros de genotipagem.

As heterozigosidades observadas e esperadas variaram de 0,516 a 0,964 e de 0,668 a 0,954, com médias de 0,796 e de 0,835, respectivamente (tabela 4.1). Dois locos desviaram do EHW, o loco Rv2 em Manaus e o loco Rv4 em Tabatinga, provavelmente devido à deficiência de heterozigotos (tabela 4.1). Não detectamos desequilíbrio de ligação entre nenhum par de locos, entretanto, o excesso de homozigotos devido à presença de alelos nulos foi

evidenciado em três locos de Tabatinga (Rv4, Rv13 e Rv16) e em um loco (Rv13) em Manaus.

Foram realizadas amplificações cruzadas entre os gêneros de Cynodontinae utilizando as mesmas condições para *R. vulpinus*. Várias genotipagens foram bem sucedidas, inclusive com a verificação de polimorfismos (tabela 4.2). Cinco locos (Rv2, Rv3, Rv13, Rv18 e Rv25) foram amplificados com sucesso nos dois outros gêneros de Cynodontinae (*Cynodon* e *Hydrolycus*), o que sugere a utilidade desses marcadores em estudos populacionais das espécies de Cynodontinae.

Os *primers* se mostraram úteis para revelar a diversidade genética de *R. vulpinus* e portanto serão utilizados no estudo da estrutura populacional dessa espécie ao longo da sua distribuição geográfica.

Tabela 4.1: Relação dos *primers*, unidade de repetição (UR), número de alelos (A) e alcance do tamanho dos fragmentos de 11 locos polimórficos de *Rhaphiodon vulpinus*. As heterozigozidades observadas e esperadas de duas localidades também são apresentadas, com os asteriscos indicando desvios do EHW.

Loco	Primer	UR	A	Alcance	Manaus		Tabatinga	
					Ho	He	Ho	He
Rv1	F: 5'- ATCAAGGGGGAGGGAGAGAACA – 3' R: 5'- GTCCCCAGTAGAAACCAACCCA – 3'	AG	26	152-212	0,935	0,947	0,964	0,954
Rv2	F: 5'- GACCTCTCAGCCATACCTGACC – 3' R: 5'- GTTGGCCATCTGCCCAAAGAC – 3'	TC	24	227-293	0,800	0,939*	0,928	0,936
Rv3	F: 5'- CAGATCCCTTTGAGGCCTTTGA – 3' R: 5'- ACCCGTGATAAACTGCAGGAGC – 3'	AG	12	126-154	0,871	0,842	0,821	0,872
Rv4	F: 5'- TAGCAAAGCAACGCCGCTC – 3' R: 5'- GCATGCAAAGCACCCCTTTTG – 3'	TC	10	194-222	0,896	0,838	0,678	0,841*
Rv6	F: 5'- GCTGAAACACTTTCACTGCCCA – 3' R: 5'- CTTCTGAGCATCAACACCTGCG – 3'	GT	22	175-239	0,903	0,888	0,928	0,913
Rv9	F: 5'- TCTAAAAGGCTAAGGCATGTGA – 3' R: 5'- TAGAATCTTGCCACTGGGCACT – 3'	GT	7	243-275	0,677	0,687	0,750	0,747
Rv13	F: 5'- GAGGCCACTAGACAATGCCAGA – 3' R: 5'- GGGCTCAGCTGACCTGCTTAAT – 3'	AAC	3	248-254	0,516	0,668	0,536	0,673
Rv16	F: 5'- ACACCGGCTGTAATTCTTGCCA – 3' R: 5'- CCAGCAGAGTTTCGCTGGAATC – 3'	TC	13	298-334	0,724	0,700	0,571	0,728
Rv18	F: 5'- GTCGCTGGAGTTGGAGAACAAAC – 3' R: 5'- GTGGGCTTCAGTCAGAACTCCT – 3'	AG	17	107-153	0,903	0,900	0,893	0,893
Rv20	F: 5'- TGATCCGAGCGTGGCATCTAAT – 3' R: 5'- ACTGTGGATGTTTCGGTGACCT – 3'	CT	21	364-484	0,806	0,851	0,643	0,755
Rv25	F: 5'- GCTCCATGAGAGGACAATGACT – 3' R: 5'- TTATGGGATTGCCTTGTGTTGT – 3'	AATAG	22	235-475	0,931	0,910	0,840	0,904

Tabela 4.2: Resultados da amplificação cruzada com outras espécies de Cynodontinae. (-) amplificação negativa, (+) amplificação positiva, (++) polimorfismos encontrados.

	Rv1	Rv2	Rv3	Rv4	Rv6	Rv9	Rv13	Rv16	Rv18	Rv20	Rv25
<i>Cynodon gibbus</i>	-	+	++	-	-	-	++	-	++	++	+
<i>Cynodon meionactis</i>	-	+	++	-	-	-	+	-	+	++	+
<i>Hydrolycus armatus</i>	-	+	-	-	-	-	++	-	+	-	+
<i>Hydrolycus tatauaia</i>	-	+	-	-	-	-	++	-	++	-	++
<i>Hydrolycus scomberoides</i>	+	+	++	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>Hydrolycus wallacei</i>	+	+	++	-	-	-	+	-	-	-	+

Capítulo 5 – História demográfica de *Rhaphiodon vulpinus* (Cynodontinae, Characiformes): evidências para a história geológica da formação das grandes bacias hidrográficas Neotropicais

Introdução

O entendimento da distribuição da biota moderna só faz sentido à luz das condições geológicas e climáticas do passado (figura 5.1), em especial nos peixes Neotropicais onde evidências fósseis, biogeográficas e de divergência molecular indicam origens muito antigas, com a maioria dos clados se originando durante o Cretáceo inferior (entre 90 e 65 milhões de anos atrás) e se tornando dominante já durante o Paleogeno superior (entre 65 e 60 milhões de anos atrás) (Albert *et al.*, 2011). A datação dos eventos geológicos indica que várias, senão a maioria, das linhagens de peixes presentes atualmente são mais antigas do que a formação moderna dos sistemas de drenagem durante o Neogeno (entre 23 e 2,5 milhões de anos atrás) (Albert & Reis, 2011). Os peixes Amazônicos também diferem de outras biotas por apresentarem baixas taxas de extinção durante todo o Cenozóico, o que, associado a uma origem antiga, permitiu a persistência e a acumulação de espécies, constituindo um desafio para estudos relacionando a ictiofauna Amazônica a eventos geológicos (Albert & Reis, 2011).

Análises filogeográficas de grupos de peixes que apresentam grandes áreas de distribuição proporcionam informações para a reconstrução de eventos históricos que originaram a sua diversificação (Montoya-Burgos, 2003). A espécie *Rhaphiodon vulpinus* apresenta uma ampla distribuição ocorrendo nos rios Amazonas, Tocantins, Capim, Orinoco, Rupununi, Paraná-Paraguai e Uruguai (Toledo-Piza, 2000), estando, assim, fragmentada.

As espécies de água doce apresentam uma distribuição naturalmente fragmentada devido à hidrografia, além disso, muitas espécies tiveram sua distribuição alterada ao longo da formação dos sistemas de drenagem atuais (i.g. formação de cachoeiras) ou por modificações antrópicas (i.g. barragens). A fragmentação do habitat tem um papel decisivo na estruturação populacional das espécies de água doce, pois ocasiona, normalmente, uma redução do tamanho populacional. O tamanho populacional reduzido em populações

isoladas pode levar a uma perda mais acentuada da variabilidade genética e da heterozigosidade, quando comparada com populações de maior tamanho, além disso, outra consequência da fragmentação é o aumento da divergência entre os isolados.

No capítulo 3 identificamos uma estruturação populacional em *Rhaphiodon vulpinus* com a existência de três unidades evolutivas significativas (UES), sendo uma na Bacia do Paraná e as outras no oeste e no leste da Bacia Amazônica. Por estar distribuído entre bacias hidrográficas distintas, não é surpreendente a existência de uma alta estruturação entre amostras de bacias separadas. Entretanto, os dados genéticos nos fornecem detalhes da história geológica dos sistemas de drenagens, através da história evolutiva de *R. vulpinus*, como por exemplo, a maior proximidade do Xingu com a Bacia do Araguaia/Tocantins do que com o resto das localidades da Bacia Amazônica.

O gênero monotípico *Rhaphiodon vulpinus* possui três características morfológicas que o distinguem dos outros gêneros da subfamília (Toledo-Piza, 2000), e é conhecida no Brasil pelos nomes populares de *dourado-cachorro*, *cachorra-facão* ou *facão* devido aos grandes dentes caninos que apresenta. A espécie foi primeiramente relatada como migradora por Agostinho *et al.* (2003) baseados na verificação da sua subida através da escada de peixes de Itaipu; entretanto os autores relatam *Rhaphiodon vulpinus* como migradora de curta distância, o que não foi corroborado no capítulo 3, que identificou o grande potencial migratório da espécie.

Além da migração, outros fatores que influenciam a estrutura de populações são: a) a fragmentação do hábitat; b) características comportamentais, como filopatria; c) padrões de dispersão e fluxo gênico ligado ao sexo (nos casos de marcadores genéticos com transmissão uniparental); d) influência diferencial da seleção natural em locos nucleares e mitocondriais; e) eventos demográficos que rompem o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética; f) distância geográfica entre subpopulações (Avise, 1994). Por isso o uso conjunto de marcadores mitocondriais e nucleares é fundamental, pois permite um conhecimento mais amplo da real estrutura de uma população (Ballard & Whitlock, 2004).

Uma ótima opção para fornecer hipóteses consistentes a respeito da estruturação populacional são os microssatélites, que possuem um grande

poder de resolução devido à alta taxa de mutação. Nos últimos anos, tem-se observado um crescimento do número de trabalhos que relatam o isolamento e a caracterização de locos de microsatélites em espécies de peixes neotropicais, com a finalidade de empregá-los em estudos de genética de populações e conservação (Moysés *et al.*, 2005; Calcagnotto *et al.*, 2001; Beheregaray & Sunnucks, 2000). Os microsatélites têm sido utilizados com sucesso em uma série de abordagens, tais como: estimativas do tamanho populacional efetivo e ocorrência de endocruzamento (Estoup *et al.*, 2001); estudos de fluxo gênico local (Waldbieser & Wolters, 1999), análise de relações evolutivas entre populações e espécies (Natoli *et al.*, 2004); e caracterização da estrutura populacional (Moysés, 2005).

A estruturação populacional em *Rhaphiodon vulpinus* foi obtida através de um marcador menos variável do que os microsatélites (Capítulo 3), entretanto a detecção de um fluxo gênico limitado torna esta espécie adequada para investigar modificações geológicas e ambientais passadas, já que a dispersão dos peixes está intimamente relacionada a ligações diretas ou captura de cabeceiras entre bacias adjacentes, o que, por sua vez, reflete mudanças geomorfológicas ou climáticas (Bermingham & Martin, 1998).

Por tudo isso, a análise de microsatélites foi escolhida para detectar a estrutura populacional de *Rhaphiodon vulpinus*, relacionando-a tanto aos dados obtidos com o sequenciamento da ATPase (Capítulo 3) quanto ao conhecimento geológico disponível, com o intuito de aumentar o conhecimento acerca da ictiofauna de água doce Neotropical.

Objetivo

Relacionar a variabilidade genética e a estruturação populacional de *Rhaphiodon vulpinus* à história geológica da formação dos grandes sistemas de drenagem Neotropicais

Material e Métodos

Foram coletados 286 exemplares de *Rhaphiodon vulpinus* de dez localidades distintas (figura 5.2 e tabela 5.1). A amostra do Rio Madeira é a única constituída por exemplares coletados em diversos pontos ao longo da bacia (tabela 5.2), pois é proveniente de coletas para o levantamento da fauna de peixes do Rio Madeira. O projeto está sendo realizado pela Universidade Federal de Rondônia (UNIR) para a empresa Santo Antônio Energia, como parte dos requisitos para a implantação da Usina Hidrelétrica (UHE) Santo Antônio.

O DNA total dos exemplares foi extraído de acordo com o protocolo de extração salina (Aljanabi & Martinez, 1997), a partir de tecidos do fígado, músculo, coração ou nadadeiras, preservados em álcool 96%.

Para a análise de 11 locos de microsatélites o DNA foi amplificado utilizando os *primers* apresentados na tabela 5.3, desenvolvidos especificamente para este estudo (Capítulo 4). A extremidade 5' do *primer forward* foi acrescida de uma cauda m13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'), que permite a hibridação com o fragmento m13 marcado com sonda fluorescente (6-FAM, HEX ou NED), segundo Schuelke (2000).

As amplificações foram realizadas utilizando 1 pmol do *primer forward*, 5 pmol do *primer reverse*, 1 pmol do *primer* universal M13, 200 µm dNTPs, 0.5 U Taq polymerase (Fermentas), 2 mm de MgCl₂ e 1x de tampão contendo HCl do kit da Fermentas, 1x de BSA e entre 60 e 150 ng de DNA molde. As condições de amplificação foram 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 48° C por 45 segundos e 72° C por 1 minuto, terminando com 10 minutos de alongação à 72 °C.

Os alelos foram visualizados através do programa Gene Marker v. 1.80 (SoftGenetics), após serem genotipados no sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyzer, do Centro de Estudos do Genoma Humano, que permite a detecção simultânea de múltiplos locos com tamanhos diferentes e até três fluorescências por genotipagem (Dye Set D) com o marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems).

A matriz de análise foi elaborada numa tabela de Excel (Microsoft Corporation), de onde foi exportada em para o uso em outros programas

através do macro GENALEX v 6.4 (Peakall & Smouse, 2006). O mesmo software foi utilizado para gerar um gráfico do padrão alélico, e no cálculo da distância genética de Nei (1978) entre as populações, que foi utilizada na elaboração de uma árvore não enraizada construída pelo método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), com o auxílio do programa PHYLIP v 3.6 (Felsenstein, 2004).

Foram estimadas as estatísticas de Nei (H_o , H_t' , D_{st}' , G_{st}' e G_{is}), as frequências alélicas, o número de alelos por loco, a diversidade gênica e a riqueza alélica (El Mousadik & Petit 1996) com o auxílio do programa Fstat (Goudet, 2001). As estatísticas F e R , os valores de heterozigosidade observada e esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Nei, 1978), os testes do EHW e do desequilíbrio de ligação e a diferenciação genotípica foram estimadas pelo programa GenePop on the web v. 3.3 (Raymond & Rousset, 1995b).

O programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) foi utilizado para estimar os valores de diversidade gênica, e heterozigosidade observada e esperada para cada população, e também para quantificar os níveis de diversidade genética dentro e entre amostras e para inferir o grau de subdivisão populacional, através da estimativa de dois parâmetros: o F_{st} e o R_{st} . A significância foi testada por reamostragens com 1000 permutações, e os resultados obtidos foram corrigidos para múltiplas comparações segundo procedimento sequencial de Bonferroni com $\alpha = 0,05$ (Rice, 1989).

Os valores linearizados de F_{ST} (Slatkin, 1995) foram utilizados para estimar a correlação entre as matrizes de distância genética e geográfica ($\ln$ da distância em Km) na análise de isolamento por distância (Wright, 1965) com padronização pelo teste de Mantel (Sokal & Rohlf, 1995) (com 10000 permutações), realizados pelo programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

A estrutura populacional foi testada no programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) através da análise de variância molecular total e por loco (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992), com dois agrupamentos: três grupos, como evidenciados pela rede de haplótipos (Amazônia, Araguaia/Xingu e Paraná); e quatro grupos, como evidenciado pelo agrupamento Bayesiano (Amazônia, Araguaia/baixo Xingu, Alto Xingu e Paraná). Os componentes da variância

genética foram calculados entre grupos, entre amostras do mesmo grupo, e entre todas as amostras; e a significância desses valores foi testada através de 1023 permutações.

A hipótese de efeito fundador devido à colonização recente foi testada utilizando o 'sign test' e o 'Wilcoxon sign-rank test' implementados no programa BOTTLENECK 1.2.2 (Piry *et al.*, 1999). Estes testes permitem detectar recente e pronunciada redução no tamanho efetivo populacional, já que tal redução está relacionada à redução no número de alelos e de heterozigosidade, sendo que a diversidade alélica é reduzida mais rapidamente (Piry *et al.*, 1999). A análise foi realizada utilizando o modelo mutacional de duas fases (Two-phased mutation model - TPM), num total de 5000 simulações, como sugerido por Piry *et al.* (1999) para dados de microsatélites.

O método de agrupamento Bayesiano implementado no programa Structure v 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para atribuir os indivíduos aos agrupamentos genéticos (K) e estimar a proporção de mistura genética (Q) de cada indivíduo. Para determinar o número mais provável de agrupamentos, os dados foram submetidos a uma busca com K entre 1 e 15, e sem considerar as localidades de coleta. A análise foi realizada assumindo frequências alélicas independentes sob o modelo de mistura, com 100.000 de burn-in, 500.000 MCMC réplicas e 10 interações por K para garantir a estabilização das estatísticas (Pritchard *et al.* 2000). Os resultados da simulação foram compactados para a visualização na versão online do programa Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2011).

Resultados

Variabilidade

Todos os 11 locos analisados (exceto Rv13) apresentaram um alto número de alelos que variou de três (Rv13) a 32 (Rv20) com média de 20 alelos por loco (220 alelos em 286 indivíduos amostrados). De uma forma geral, encontramos uma maior diversidade alélica na Bacia Amazônica (amostras RO, AM, RR, TBT e PU), seguida pelo grupo Araguaia/Xingu (GO, PA e MT) e Paraná (SP e PR), respectivamente (tabelas 5.4 a 5.11). Nas localidades da Bacia do Paraná, a maioria dos locos apresenta dois alelos cujas frequências somadas correspondem a mais de 80% dos alelos encontrados, sendo que nos locos Rv2 e Rv18 um único alelo possui frequência superior a 75%. A amostra do alto Xingu (MT) também apresenta um alelo amplamente distribuído nos locos Rv13 e Rv16, com frequência de mais de 70% (tabela 5.8). É interessante notar também que na maioria dos locos, um dos alelos mais frequentes da Bacia do Paraná não está entre os mais frequentes encontrados nas outras bacias.

A distribuição de alelos exclusivos tende a ser estruturada geograficamente. Foram obtidos 41 alelos restritos a uma única amostra, sendo que a maior parte (11 alelos) é encontrada na amostra do Rio Amazonas, que está no centro da Bacia Amazônica. As localidades TBT e GO (oeste e leste da Amazônia, respectivamente) apresentam seis alelos restritos, enquanto que as localidades da Bacia do Paraná apresentam apenas dois alelos restritos cada.

A riqueza alélica total, que é a medida do número de alelos por loco padronizado pelo tamanho da amostra, variou de 2,834 (Rv13) a 6,435 (Rv1) com uma média de 4,737 e as heterozigosidades variaram de 0,537 a 0,849 para a observada e de 0,662 a 0,944 para a esperada, com médias de 0,710 e 0,820 respectivamente (tabela 5.12).

Os valores de diversidade gênica nas amostras variaram de 0,541 (SP) a 0,833 (RR) e os de heterozigosidade variaram de 0,521 (SP) a 0,815 (AM), com os menores valores na Bacia do Paraná e os maiores na Bacia Amazônica (excluindo o Xingu) (tabela 5.13). A figura 5.3 evidencia a variação da heterozigosidade e o padrão alélico entre as localidades. A redução e/ou perda

da variabilidade genética estão associadas à ocorrência recente de gargalos evolutivos. A hipótese de gargalo genético foi testada e rejeitada para todas as localidades tanto no *sign test* quanto no *Wilcoxon sign-rank test* (exceto PA com o *sign test*) (tabela 5.13). Entretanto, após a análise dos grupos genéticos obtidos no capítulo 3, um gargalo populacional foi detectado no grupo do leste da Bacia Amazônica (tabela 5.14),

Análises individuais em cada um dos 11 locos evidenciaram baixos valores de diversidade gênica, riqueza alélica e heterozigosidade na Bacia do Paraná, seguida pelas amostras do Rio Xingu (especialmente o alto Xingu), do Rio Araguaia, e do restante da Bacia Amazônica, que apresentam valores elevados de diversidade (tabela 5.15).

Em relação ao equilíbrio de HW (tabela 5.12), os dados totais desviaram significativamente do equilíbrio, mas individualmente apenas três locos (Rv4, Rv9 e Rv18) apresentaram valores significantes. Estes locos também apresentaram desvios significativos em ao menos duas localidades distintas. Na tabela 5.16 apresentamos 15 desvios do equilíbrio de HW nas amostras, a maioria relacionada aos locos acima. A amostra SP é a que possui o maior número de locos desviando do equilíbrio de HW (4), enquanto que a amostra PA possui apenas o loco Rv18 desviando do equilíbrio. Ambas as localidades desviaram do equilíbrio de HW na análise com todos os locos (tabela 5.13)

O teste de desequilíbrio de ligação na amostra total evidenciou cinco pares significantes, entretanto, apenas três continuaram significantes após a correção de Bonferroni (tabela 5.17). O desequilíbrio por localidade apresentou ao menos um par de locos em desequilíbrio por amostra, exceto PU onde não foi possível calcular devido ao baixo número amostral (tabela 5.17). A amostra do Rio Madeira (RO) foi a que apresentou o maior número de locos em desequilíbrio, e a única que apresentou pares significantes após a correção de Bonferroni (os mesmos que estão em desequilíbrio na amostra total).

A tabela 5.12 apresenta os coeficientes de endogamia para cada loco em todos os indivíduos amostrados, e de uma forma geral, as estatísticas Rho geraram valores mais elevados em relação às outras estatísticas. É interessante notar que o loco Rv25 apresenta valores discrepantes de endogamia causada pela subdivisão (Rst em relação às outras estatísticas). Os valores totais de endogamia encontrados não são muito elevados e, em sua

maioria, são o resultado de subdivisões populacionais; exceto no loco Rv9, onde a endogamia dentro das subdivisões é mais elevada do que entre as subdivisões.

O Loco Rv6 é o que possui os menores coeficientes de endogamia total, entretanto revela uma moderada subdivisão populacional, já os locos Rv16 e Rv20 apresentam valores similares e moderados de endogamia dentro e entre as subdivisões. No loco Rv3 os valores de R_{is} e R_{st} são próximos, mas os valores de F_{is} e F_{st} são discrepantes, com a maior parte da endogamia relativa à subdivisão, enquanto que o loco Rv4 apresenta uma situação inversa, com o R_{st} indicando a subdivisão ($R_{st} = 0,25$). Outros três locos (Rv13, Rv18 e Rv25) também apresentaram valores elevados de R_{st} (superiores a 0,25).

Os índices de endogamia encontrados dentro das amostras também são considerados baixos, exceto na amostra proveniente do Peru que possui poucos exemplares amostrados (tabela 5.13), e por isso, os valores de endogamia devem ser vistos com cautela. Em relação às outras amostras, na tabela 5.16 é possível evidenciar 18 valores em ambas as estatísticas entre moderados e altos, a maioria nos locos Rv4, Rv9, Rv16 e Rv18 (três em cada). O número de locos com valores altos de endogamia por amostra variou entre um e três locos. Entretanto 30 comparações apresentaram valores conflitantes entre as estatísticas, ou seja, um alto e outro baixo, sendo 18 com R_{is} alto e 12 com F_{is} alto (tabela 5.16). A maioria dos conflitos está nos locos Rv20, Rv2 e Rv9.

Relações entre as amostras

As relações entre as amostras foram estimadas pela análise de pares utilizando a diferenciação genotípica, o F_{st} e o R_{st} , entretanto, devido ao seu baixo número amostral, a amostra PU foi retirada das análises.

Testes de diferenciação genotípica para cada um dos locos analisados (exceto Rv9) revelaram valores significantes entre quase todas as comparações entre as bacias do Paraná (SP e PR), do Araguaia (GO), do Xingu (PA e MT) e Amazônica (RO, AM, RR e TBT) (tabelas 5.18 a 5.23). Entretanto vale a pena ressaltar que o loco Rv4 não distingue inequivocamente todas as amostras do Araguaia/Xingu das outras amostras da Bacia Amazônica

(tabela 5.19), enquanto que o loco Rv13 distingue esses grupos, mas não distingue as amostras do Paraná das outras amostras da Bacia Amazônica (tabela 5.21). É interessante notar que as amostras GO e PA apresentam em vários locos uma diferenciação genotípica menor do que as amostras do Xingu entre si (PA e MT), além disso, o loco Rv16 evidencia, após a correção de Bonferroni, uma baixa diferenciação (valores não significantes) entre as amostras da Bacia do Paraná e o alto Xingu (tabela 5.21), localidades separadas por mais de 7.000 km de distância fluvial (na hipótese de conexões entre as bacias do Madeira e do Paraguai). O loco Rv9 é o que apresenta o menor número de valores significantes, entretanto diversos valores perderam a significância após a correção de Bonferroni, a maioria relacionada à diferenciação entre as bacias do Paraná e Amazônica e do Xingu e Amazônica (tabela 5.20). A tabela 5.23 apresenta a análise da diferenciação genotípica de todos os locos e evidencia uma acentuada diferenciação entre todas as amostras, com as amostras da Bacia Amazônica (exceto Xingu) pouco diferenciadas entre si (com exceção de RO).

Os valores de F_{st} e R_{st} também apresentaram diferenciação significativa na comparação entre os grupos do Paraná, do Araguaia/Xingu e do restante da Bacia Amazônica (tabela 5.24), entretanto, o grupo Araguaia/Xingu apresenta diferenças entre todas as amostras com o F_{st} , mas com o R_{st} a diferença entre GO (Rio Araguaia) e PA (baixo Xingu) não é significativa após a correção de Bonferroni. A tabela 5.25 apresenta os valores médios de F_{st} e R_{st} dentro e entre três grupos de amostras (grupos Paraná, Araguaia/Xingu e Amazonas) evidenciando uma baixa diferenciação dentro dos grupos, e valores de moderados a altos entre os grupos. Comparando as tabelas podemos perceber que os valores máximos envolvendo o grupo Araguaia/Xingu são encontrados na amostra do alto Xingu (MT) em relação às outras, o que indica diferenciação dentro deste grupo.

Outra medida de divergência foi utilizada para na elaboração de um dendrograma, que evidenciou três agrupamentos de amostras: grupo da Bacia do Paraná, grupo Araguaia/Xingu, o restante da Bacia Amazônica numa posição intermediária (figura 5.4). É interessante notar que duas amostras se apresentaram mais diferenciadas das outras do grupo: RO (grupo Amazônia) e MT (grupo Araguaia/Xingu).

A análise Bayesiana para atribuir os indivíduos a agrupamentos genéticos resultou em um $K = 4$ populações compostas: I) pelas amostras do Paraná (SP e PR); II) pelas amostras RO, AM, RR, PU e TBT (oeste da Bacia Amazônica); III) pelas amostras GO (Rio Araguaia) e PA (baixo Xingu); e IV) pela amostra do alto Xingu (MT) (figura 5.5). Na figura 5.6 podemos perceber que o grupo do Paraná é o que possui a menor contribuição dos outros grupos. Os grupos GO/PA e MT, como era esperado, possuem mais migrantes entre si do que com as outras localidades. Já o grupo composto pelas amostras do oeste da Bacia Amazônica apresenta contribuição de todos os outros grupos, especialmente da Bacia do Paraná, que possui uma alta proporção nos indivíduos do Rio Madeira (particularmente no alto Madeira) (figura 5.6 e tabela 5.2). As populações estimadas são bastante concisas e refletem um fluxo gênico restrito entre os agrupamentos.

O F_{st} de Slatkin foi utilizado para testar a correlação com a distância geográfica através do teste de Mantel, que mostrou significância entre as matrizes ($r = 0.79$, $p < 0.000$), sugerindo um padrão de isolamento por distância (figura 5.7). Apesar de a Bacia do Paraná estar separada da Bacia Amazônica, a distância geográfica entre as amostras foi estimada através de uma possível conexão via Rio Guaporé com a Bacia do Paraguai; entretanto, retirando as amostras da Bacia do Paraná o padrão de isolamento pela distância permanece ($r = 0.62$, $p = 0.016$) (figura 5.7).

A análise hierárquica baseada na variância (AMOVA) detectou diferenciação significativa em todos os níveis, incluindo entre grupos (tabela 5.26). Foram testados dois agrupamentos: um baseado nos resultados com o mtDNA (Paraná, Araguaia/Xingu e Amazônica), e outro baseado nos resultados da análise Bayesiana de agrupamentos, com a subdivisão do Araguaia/Xingu em alto Xingu e Araguaia/baixo Xingu. A maior diferenciação é encontrada entre as localidades (mais de 85%), seguida pela diferenciação entre grupos (três ou quatro e ambos em torno de 12%), com uma baixa diferenciação entre as amostras de um mesmo grupo (reduzida quase pela metade com a subdivisão do grupo Araguaia/Xingu).

Numa abordagem mais detalhada (tabela 5.27), podemos perceber que quase todos os locos detectam a diferenciação nos três níveis hierárquicos. A exceção mais marcante é o loco Rv9 que possui mais de 97% da sua variação

entre amostras, com diferenciação significativa; porém, não há significância nos outros níveis hierárquicos. Comparando os resultados obtidos para três ou quatro grupos, notamos que o Rv16 é um loco com muita informação para a subdivisão do Araguaia/Xingu, e que com essa subdivisão quatro locos perderam a capacidade de diferenciar amostras dentro de um grupo (tabela 5.27).

Discussão

Os mesmos três grupos encontrados na análise com a ATPase (Capítulo 3) foram visualizados no dendrograma da distância de Nei (1978), entretanto a análise Bayesiana evidenciou quatro agrupamentos genéticos. O grupo do leste da Amazônia (bacias do Araguaia e Xingu) foi subdividido em alto Xingu (MT) e Araguaia/baixo Xingu, devido à diferenciação da amostra MT em relação às outras. O isolamento desta localidade foi evidenciado em todos os testes (i.e. diferenciação genotípica com todos os locos, F_{st} e R_{st}).

Variabilidade

A maioria dos 11 locos de microssatélites analisados apresentou um alto polimorfismo (i.e. com mais de 25 alelos), sendo que os maiores valores de diversidade foram encontrados nos locos Rv1, Rv2, Rv6 e Rv25. Os locos Rv1, Rv6, Rv13 e Rv25 não apresentaram significância no teste do equilíbrio de HW nas amostras, mas quinze desvios foram encontrados. A maioria dos desvios está relacionada aos locos Rv4, Rv9 e Rv18, que foram também os locos significantes na análise com todos os exemplares de *R. vulpinus*. O loco Rv9 é o único que apresenta a endogamia dentro das subdivisões mais elevada do que entre as subdivisões, sendo que todos os outros locos evidenciaram subdivisão populacional.

O teste de desequilíbrio de ligação para todos os exemplares de *R. vulpinus* apresentou três comparações significativas, que também são significantes em RO. A amostra do Rio Madeira apresenta alelos do grupo Paraná, assim como a amostra total, e os resultados podem estar refletindo a grande diferença entre os grupos da Bacia do Paraná e do oeste da Amazônia,

já que, além da ligação e da recombinação, a seleção, a mutação, a deriva genética e a estrutura populacional (e.g. fluxo gênico, endocruzamento, gargalo,...) influenciam o desequilíbrio em uma população.

Assim, acreditamos que a estruturação populacional seja a responsável pela significância das comparações, refletindo um evento cladístico antigo (e.g. divisão entre as bacias Amazônica e do Paraná), que também é detectado na amostra do Rio Madeira devido a um fluxo gênico unidirecional entre os grupos Paraná e Amazônia (captura de cabeceiras).

A estabilidade das amostras de *R. vulpinus* foi evidenciada pelo teste EHW que apresentou desvios apenas em duas localidades (SP e PA). O equilíbrio pode ser quebrado por vários fatores, entre eles o tamanho populacional reduzido, o endocruzamento, o efeito fundador e a migração. Testes em SP e PA apresentaram valores baixos de endogamia (assim com nas outras localidades) e refutaram um gargalo genético, entretanto na amostra SP encontramos quatro locos que desviaram do equilíbrio de HW, a maioria devido a um déficit de heterozigotos. Tal fato é um indício de redução de variabilidade no alto Paraná, que é a localidade colonizada mais recentemente, o que indica a influência do efeito fundador nessa amostra.

A migração pode ser o fator responsável pela perda do equilíbrio em PA, já que essa amostra é proveniente do baixo Xingu e provavelmente recebe migrantes de grupos genéticos distintos. Entretanto, outros fatores devem estar envolvidos, pois a amostra de RO não apresentou significância embora tenha recebido migrantes do divergente grupo Paraná. Vale ressaltar, no entanto, que os valores obtidos no Rio Madeira estão muito mais perto da significância do que os outros valores do grupo do oeste da Amazônia, incluindo a localidade de menor número amostral. O teste de EHW por loco dentro de cada amostra evidenciou que a maioria dos desvios está relacionada a um déficit de heterozigotos, principalmente na amostra PU, que possui um baixo número amostral, e no grupo Paraná (em especial no alto Paraná), o que pode estar relacionado também a um maior impacto antrópico sobre esta bacia.

Em relação à diversidade, os grupos genéticos apresentaram um padrão de similar ao obtido pelo sequenciamento da ATPase (Capítulo 3), com os menores valores sendo encontrados na Bacia do Paraná e os maiores no oeste da Amazônia, tanto na análise com todos os locos quanto nas análises por

loco. No oeste da Amazônia, os menores valores foram encontrados em RO, o que pode estar relacionado à existência do efeito Wahlund no Rio Madeira, já que essa localidade é composta por um *pool* gênico proveniente majoritariamente do grupo Amazônia, mas também do grupo Paraná.

No leste da Amazônia podemos perceber que a amostra do alto Xingu possui ao menos três locos com expressiva redução de diversidade, entretanto o grupo Paraná é o que possui o mais expressivo decréscimo em relação aos outros. A redução da diversidade biológica pode ser devida a mudanças nas condições de vida de *Rhaphiodon vulpinus* ocasionada por alterações ambientais. Desta forma, propomos que a amostra do alto Xingu deve ter se separado do baixo Xingu devido às cachoeiras presentes no médio Xingu, o que ocasionou uma redução de área de vida com quebra do fluxo gênico entre as localidades deste rio, levando ao declínio de diversidade observado no alto Xingu. Quanto às amostras da Bacia do Paraná, não descartamos a hipótese de que a baixa diversidade esteja relacionada, além do efeito fundador, às alterações ambientais causadas pela ação antrópica, já que esta bacia está localizada na região mais desenvolvida e mais devastada, com a presença de grandes cidades marginais e diversos reservatórios em cascata.

Baixos valores de diversidade podem estar relacionados à diminuição do tamanho populacional, entretanto, segundo Grant & Brown (1998), em populações de baixa diversidade é difícil distinguir entre a colonização recente (efeito fundador) e diminuições do tamanho populacional (efeito gargalo), porque os efeitos de ambos os processos sobre a diversidade genética são idênticos. Entretanto, testes específicos realizados pelo programa Bottleneck permitem detectar redução no tamanho efetivo populacional, já que a diversidade alélica é reduzida mais rapidamente do que a heterozigosidade (Piry *et al.*, 1999).

A hipótese de gargalo populacional foi refutada nas amostras individualmente (exceto o *sign test* em PA), entretanto, após a delimitação dos grupos genéticos, os testes detectaram um gargalo no grupo do leste da Bacia Amazônica. É interessante notar que apesar de o grupo da Bacia do Paraná apresentar uma diversidade bem menor, não detectamos indícios de gargalo, o que reforça a hipótese de que o efeito fundador contribua para os baixos índices de diversidade na Bacia do Paraná. Entretanto, a influência dos efeitos

antrópicos (como a fragmentação do hábitat) deve de investigada a longo prazo.

Estruturação populacional e padrões demográficos

Os grupos inferidos tanto pela análise mitocondrial e quanto pela Bayesiana foram testados e corroborados pela AMOVA, que mostrou a maior diferenciação entre as amostras, o que demonstra a grande variabilidade obtida pela análise de microssatélites. Entretanto, pelo DNA mitocondrial, a maior diversidade é encontrada entre grupos (Capítulo 3), o que evidencia a grande capacidade da ATPase 6/8 na detecção da estruturação populacional básica de *R. vulpinus*. É interessante notar que, apesar da alta variabilidade dos microssatélites, a variação entre amostras de um mesmo grupo é muito baixa, especialmente após a subdivisão do grupo do leste da Amazônia.

Esta subdivisão faz com que quatro locos na AMOVA percam a capacidade de distinguir amostras dentro do mesmo grupo, evidenciando a grande similaridade dentro de cada um dos quatro grupos genéticos de *R. vulpinus*, apesar de as distâncias geográficas dentro dos grupos variarem de 470 km (entre PU e TBT) a mais de 2300 Km (entre GO e PA). Dessa forma, os resultados indicam que *Rhaphiodon vulpinus*, possui uma grande capacidade migratória na ausência de barreiras física (atuais ou históricas).

Observamos também a estruturação através da análise do F_{st} e do R_{st} com todas as amostras, que revelaram valores entre 0,06 e 0,23 para o F_{st} e entre 0,05 a 0,37 para o R_{st} . Segundo Wright (1978), valores de F_{st} entre 0 e 0,05 evidenciam uma baixa estruturação, entre 0,05 e 0,15 uma moderada estruturação, e entre 0,15 e 0,25 uma alta estruturação. Desta forma, com base nos resultados anteriores (Capítulo 3) e no F_{st} podemos dizer que *R. vulpinus* apresenta alta estruturação populacional não só entre as três grandes UES, como também entre elas e o alto Xingu.

O alto Xingu apresentou pequena contribuição dos outros grupos, sendo a maior contribuição, como esperado, proveniente do Araguaia/baixo Xingu. Além da diferenciação genética, um fato interessante dentro desta UES, é a evidência de uma maior contribuição do alto Xingu para o Araguaia do que para

o baixo Xingu, o que pode evidenciar captura de cabeceiras da Bacia do Xingu para a Bacia do Araguaia.

O grupo da Bacia do Paraná foi o que apresentou a menor contribuição dos outros grupos, o que já era esperado devido ao isolamento atual entre a Bacia do Paraná-Paraguai e a região Amazônica. Entretanto, a hipótese de contato secundário entre as bacias do Paraná-Paraguai e do Madeira proposta no capítulo 3, foi evidenciada pela grande contribuição do grupo Paraná em indivíduos do Rio Madeira coletados a montante da Cachoeira de Teotônio (tabela 5.2). Entretanto, devido ao fluxo unidirecional, propomos que o contato entre estas bacias seja o resultado de captura de cabeceiras do sistema Paraná-Paraguai para a drenagem do Rio Madeira.

O grupo do oeste da Amazônia apresenta contribuição de todos os outros grupos e, após RO, a amostra que apresenta a maior contribuição de outros grupos, especialmente do leste da Amazônia, é a amostra do Rio Branco (RR). Uma grande vantagem deste tipo de análise é o posicionamento inequívoco da amostra PU no grupo Amazônia (apesar do pequeno número amostral) devido ao poder de resolução dos microssatélites.

A análise de diferenciação genotípica nos permite inferir a forma como ocorre a estruturação, já que, com exceção do loco Rv9, todos os outros locos indicam a existência de algum grau de diferenciação entre os grupos genéticos obtidos pela análise de agrupamentos (Bacia do Paraná, oeste da Amazônia, Araguaia/baixo Xingu, e alto Xingu). Assim, excluindo o loco Rv9 da discussão de diferenciação genotípica, temos que dentro do grupo da Bacia do Paraná não há diferenciação nos locos individualmente (mas há com todos juntos). Além disso, este grupo só não se diferencia das outras amostras com os locos Rv13 (conexão com grupo do oeste da Amazônia) e Rv16 (conexão com o alto Xingu), porém estas significâncias foram perdidas após a correção de Bonferroni, o que indica que estão num limiar estatístico, podendo, entretanto, refletir conexões históricas entre bacias.

A conexão da Bacia do Paraná com o oeste da Amazônia não surpreende, já que esta hipótese foi comprovada pela análise de agrupamentos com a detecção de migrantes do grupo Paraná para uma amostra do grupo do oeste da Amazônia (RO). Entretanto, considerando esta hipótese, o grupo Paraná estaria separado do alto Xingu por mais de 7.000 km de distância

fluvial, o que nos faz considerar que o loco Rv16 possa estar detectando algum evento de troca de faunas entre as bacias do Paraná e do Xingu, ocasionado provavelmente, pela captura de riachos de uma drenagem para a outra.

Dentro do grupo do oeste da Amazônia, foram encontradas comparações significantes que indicam a diferenciação da amostra do Rio Madeira em relação à AM ou RR (locos Rv2, Rv4 e Rv18), o que é evidenciado também na análise total. Era esperado que alguns locos refletissem a diferenciação de RO em relação às outras amostras do grupo do oeste da Amazônia, já que os resultados da análise de agrupamentos indicaram claramente o contato desta amostra com o grupo da Bacia do Paraná (bastante diferenciado dos grupos da região Amazônica).

A história do alto Xingu é interessante, pois três locos (Rv3, Rv4 e Rv13) podem estar indicando um contato com a amostra GO do grupo Araguaia/baixo Xingu, o que pode indicar outro evento de troca de faunas devido à captura de riachos, mas agora entre as porções altas dos rios Araguaia e Xingu. É interessante notar que apenas o loco Rv4 não diferenciou o alto do baixo Xingu, o que indica uma separação relativamente antiga entre esses trechos, provavelmente devido às cachoeiras existentes no médio Xingu (especialmente a Cachoeira de Volta Grande, próxima à Belo Monte).

Entre as amostras do grupo Araguaia/baixo Xingu, além da análise total, os locos Rv1, Rv2, Rv6 e Rv25 evidenciaram diferenciação (os mesmos que apresentam os maiores valores de diversidade), o que indica que a história demográfica de *R. vulpinus* no leste da Amazônia necessita ser melhor investigada, com a inclusão de localidades dos trechos médios das sub-bacias do Araguaia e do Xingu, além de coletas no Rio Tocantins e no Rio Tapajós (localizado entre os dois agrupamentos encontrados na região amazônica).

Entre as amostras do grupo Araguaia/baixo Xingu, a amostra do baixo Xingu parece estar mais relacionada ao grupo do oeste da Amazônia, o que não foi surpresa já que *R. vulpinus* apresenta um isolamento pela distância e a amostra PA está geograficamente mais próxima das amostras do grupo Amazônia. É interessante notar que a correlação positiva entre o F_{st} de Slatkin e a distância geográfica foi encontrada tanto na amostra total quanto nas amostras restritas à Bacia Amazônica, o que é mais um indício da grande capacidade migratória de *R. vulpinus* na ausência de barreiras. A capacidade

de dispersão dessa espécie já havia sido observada no alto Paraná com a dispersão de mais de 500 km entre Itaipu e o alto Paraná (a partir de 1983). Por este fator, podemos inferir que a espécie poderia estar amplamente distribuída na Bacia do Paraná na ausência de obstáculos para a dispersão, em especial as barragens.

Embora a análise com todos os locos indique a subdivisão dentro da região amazônica (oeste e leste), nenhum loco individualmente consegue separar todas as amostras nesses grupos, entretanto, a maioria perde a significância somente após a correção de Bonferroni, o que indica a presença de pequenas diferenças entre as amostras do oeste e do leste da Bacia Amazônica. A nossa hipótese é que essas diferenças reflitam um padrão histórico de isolamento em *R. vulpinus*, como detectado claramente pela análise da APTase (Capítulo 3); entretanto, acreditamos que a tendência demográfica desta espécie seja no sentido de homogeneizar as diferenças entre o leste e o oeste da Amazônia; exceto o alto Xingu que parece estar isolado.

Considerações filogeográficas

O entendimento sobre a distribuição de muitas espécies de peixes Neotropicais só faz sentido sob uma perspectiva histórica já que diversos clados parecem ter origem muito antiga (Albert *et al.*, 2011). Evidências (fósseis, biogeografia e divergência molecular) indicam que muitas das linhagens de peixes presentes atualmente são mais antigas do que a formação moderna dos sistemas de drenagem durante o Neogeno (entre 23 e 2,5 milhões de anos atrás) (Albert & Reis, 2011). De fato, a origem da maioria dos clados parece ser durante o Cretáceo inferior (entre 90 e 65 milhões de anos atrás), com irradiação durante o Paleogeno superior (entre 65 e 60 milhões de anos atrás) (Albert *et al.*, 2011).

Além disso, os peixes Amazônicos diferem de outras biotas por apresentarem baixas taxas de extinção durante o Cenozóico, provavelmente devido à heterogeneidade de habitats, às interconexões entre drenagens adjacentes e à habilidade de muitas espécies em coexistir em simpatria (Albert *et al.*, 2011).

Os registros fósseis dos cynodontídeos não contribuem para a hipótese de uma origem muito antiga já que datam do Mioceno (entre 23 e 5 milhões de anos atrás), porém, registros fósseis podem ser escassos, principalmente em regiões muito dinâmicas ao longo da história geológica, como as bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai. Entretanto, é interessante notar que caninos de cynodontídeos foram encontrados em depósitos localizados na Bacia do Paraná-Paraguai (Lundberg, 1997), onde atualmente só é encontrada a espécie *R. vulpinus* o que indica a presença dessa espécie na Bacia do Paraná-Paraguai desde o Mioceno (a partir de 23 milhões de anos atrás).

Entretanto, baseada na distribuição de *R. vulpinus* abrangendo as bacias do Prata (Paraná-Paraguai e Uruguai) e do Amazonas, uma história evolutiva ainda mais antiga é prevista, imaginando a captura de cabeceiras do proto Amazonas-Orinoco para o alto Paraguai ocorrida entre 40 e 30 milhões de anos atrás (Eoceno-Oligoceno) como o evento responsável pela expansão da distribuição de *R. vulpinus* da Bacia Amazônica para a Bacia do Paraná-Paraguai.

Lundberg *et al.* (1998) datam não só este evento, como também a formação de uma barreira entre as bacias acima (*Chapare Buttress*, entre 30 e 20 milhões de anos atrás) e a captura de cabeceiras do alto Paraguai para o Amazonas ocorrida pelo deslocamento para o sul da barreira entre as bacias (Arco Michicola, entre 11.8 e 10 milhões de anos atrás). Os dados genéticos obtidos tanto com o mtDNA (Capítulo 3) quanto com os microssatélites, indicam a divergência entre a Bacia Amazônica e a Bacia do Paraná, mas indicam também o contato entre essas bacias, com a contribuição unidirecional da Bacia do Paraná para a Bacia Amazônica via Rio Madeira, o que está de acordo com a história geológica proposta por Lundberg *et al.* (1998).

Desta forma, confirmamos que a origem de *R. vulpinus* na Bacia do Paraná está associada à captura de cabeceiras do proto Amazonas-Orinoco para o alto Paraguai (entre 40 e 30 milhões de anos atrás), já que o grupo genético do Paraná é mais próximo do grupo do oeste da Amazônia (região do proto Amazonas-Orinoco) do que do grupo leste da Amazônia. Além disso, baseado na história geológica, o contato entre o grupo do Paraná e o Rio Madeira teria ocorrido 11.8 e 10 milhões de anos atrás, com a captura de cabeceiras do alto Paraguai para a sub-bacia do Rio Madeira (via rios Guaporé ou Mamoré) (Carvalho & Albert, 2011).

Vale ressaltar que esta captura teria ocorrido via alto Paraguai, o que implica que durante o Mioceno inferior *R. vulpinus* deveria ser uma espécie abundante nessa bacia, o que não é observado atualmente, já que existem poucos exemplares em coleções biológicas (ver Toledo-Piza, 2000). O trabalho de Toledo-Piza (2000) também indica a distribuição de *R. vulpinus* no Rio Uruguai, entretanto, segundo Malabarba (comunicação pessoal) essa espécie não é coletada nesse rio há décadas. É interessante notar que a captura ocorre na mesma época da transgressão da formação Paraná, onde o auge é o Mar Paranaense, o que pode explicar o quase desaparecimento de *R. vulpinus* nas bacias do Paraguai e do Uruguai. Vale ressaltar que Agostinho *et al.* (2003) afirmam que a presença dessa espécie no alto Paraná decorre de uma colonização dos trechos superiores devida à inundação de uma barreira natural (Cachoeira das Sete Quedas) após a construção da represa de Itaipu em 1983^o que explica a menor variabilidade da amostra do alto Paraná (SP) em relação à amostra do reservatório de Itaipu (PR).

Os resultados obtidos para a região Amazônica evidenciaram dois grandes grupos formados por amostras do oeste e do leste, o que indica uma origem muito mais antiga para *R. vulpinus*. A presença desses grupos genéticos distintos indica um isolamento reprodutivo por um longo período de tempo, desta forma, analisando os dados geológicos disponíveis (Lundberg *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 2011), propomos que *R. vulpinus* exista em toda a região Amazônica antes do Mioceno inferior, já que nessa época (cerca de 10 milhões de anos atrás) ocorreu a mistura de faunas entre o leste e o oeste da região Amazônica, áreas separadas durante o Paleogeno pelos arcos Monte Alegre (Paleoceno-Eoceno, entre 65 e 35 Ma) ou Purús (Oligoceno-Mioceno, entre 35 e 11 Ma) (figura 5.1), o que resultou em uma região drenando para o oeste e outra para o leste (Albert & Reis, 2011).

O Arco Purús se localiza perto da boca do Purús e acima das bocas dos rios Negro e Madeira, enquanto que o Arco Monte Alegre se localiza entre as bocas dos rios Tapajós e Tocantins (figura 5.1) (Albert & Reis, 2011). Devido à localização destes arcos, os resultados obtidos indicam que o soerguimento do Arco Monte Alegre gerou uma barreira para *R. vulpinus*, separando a espécie nos dois grandes grupos aqui encontrados, o que evidencia que a espécie é anterior a 35 Ma. Somente com a total quebra da barreira do Arco Purús, por volta de 9 milhões de anos atrás, os grupos do leste e do oeste voltaram a se encontrar.

É interessante notar que a estruturação observada em *R. vulpinus* reflete um passado muito distante (entre 65 e 35 Ma) que está mais relacionado à história geológica do que à formação moderna dos sistemas de drenagem durante o Neogeno, o que corrobora outros estudos que dizem que a maioria dos clados de peixes Neotropicais se originou durante o Cretáceo inferior e se tornou dominante no Paleogeno superior (entre 65 e 60 milhões de anos atrás) (Albert *et al.*, 2011).

Entretanto, a formação moderna pode ser a responsável pelos indícios de variação no tamanho populacional observados no leste (gargalo) e no oeste (expansão) da Bacia Amazônica (Capítulo 3), já que a região oeste sofreu grande influência do Lago Pebas (entre 11.8 e 10 Ma), que deve ter sido uma barreira para a dispersão de *R. vulpinus*; além disso, a região só apresentou sua configuração atual (com a grande variedade de habitats aquáticos) após o

soerguimento final do Arco Fitzcaraldo entre 10 e 3 milhões de anos atrás (Albert & Reis, 2011). A região leste da Amazônia, apesar de estar boa parte localizada numa região mais estável (o Escudo Brasileiro), sofreu a influencia de atividades tectônicas devido a falhas relacionadas à divergência da margem leste da Plataforma Sul-Americana (Lima e Ribeiro, 2011).

Apesar dos avanços no entendimento geológico dos sistemas de drenagem da região Neotropical observado nas últimas décadas (em especial a relação entre as bacias hidrográficas atuais), o conhecimento dos eventos no nível de sub-bacias ainda é escasso. O Rio Xingu, por exemplo, é caracterizado por processos estáveis de erosão e sedimentação, com a ocorrência de eventos geológicos que levaram à formação de uma série cachoeiras e corredeiras, que favoreceram a biodiversidade e influenciaram os padrões de distribuição da fauna aquática (Camargo *et al.*, 2004). Baseado nos padrões de distribuição da ictiofauna, Abell *et al.* (2008) subdividiram o Rio Xingu em duas áreas (ecorregiões) com a Cachoeira de Volta Grande como o divisor entre as ecorregiões (ER) 322 (Xingu) e 323 (Estuário do Amazonas e drenagens costeiras), o que condiz com os resultados obtidos (i.e. isolamento genético entre amostras do Xingu), por isso, acreditamos que as cachoeiras e corredeiras presentes no médio Xingu (em especial a Cachoeira de Volta Grande) tenham levado à quebra do fluxo gênico entre as localidades deste rio, o que pode ter levado à redução da área de vida da população do alto Xingu (ER322), ocasionando um declínio na diversidade quando comparada ao baixo Xingu (ER323). Toledo-Piza (2000) já havia notado características distintas em três espécimes grandes do Rio Xingu (alto Xingu), entretanto a autora considerou-os como variações morfológicas de *R. vulpinus*, o que foi confirmado pelas análises com o citocromo oxidase subunidade 1 (dados não apresentados).

Vale ressaltar que Camargo *et al.* (2004) encontraram *R. vulpinus* em toda a Bacia do Xingu (exceto na microbacia do Rio Irirí), atribuindo isso a uma plasticidade ontogenética que tornaria essa espécie capaz de lidar com mudanças ambientais súbitas, o que poderia explicar também a ampla distribuição de *R. vulpinus* em sistemas de drenagens tão diversos e a expansão observada no oeste da região Amazônia que é a área com maior heterogeneidade de habitats e com interconexões entre drenagens adjacentes

(e.g. Paraguai e Orinoco). Na região oeste da Amazônia, o Rio Madeira se destaca não somente pela detecção do contato entre drenagens como também pela identificação de uma barreira recente, a Cachoeira do Teotônio. Propomos que a formação da cachoeira é recente porque a ausência de fluxo gênico é detectada pelas análises com microssatélites, mas não pela análise do mtDNA (Capítulo 3), entretanto não encontramos referências sobre a época de formação da Cachoeira do Teotônio.

Com base no padrão de estruturação discutido, podemos afirmar que amostragens no Rio Tapajós seriam interessantes, já que esse grande tributário fica entre os grupos genéticos aqui obtidos, tornando a região importante para o estabelecimento do padrão de fluxo gênico entre os grupos de *R. vulpinus* da região Amazônica. Segundo a hipótese do Arco Monte Alegre como barreira, podemos esperar que as amostras do Rio Tapajós pertençam ao grupo do oeste da Bacia Amazônica, entretanto, devido a proximidade dessa região com o grupo de leste e como *R. vulpinus* parece apresentar um padrão de isolamento pela distância, imaginamos obter uma maior contribuição do grupo do leste nesta localidade do que observamos nas nossas amostragens (com distância mínima de 1.100 Km entre AM e PA).

Outros pontos interessantes seriam aqueles de drenagens não amostradas, especialmente a Bacia do Orinoco, já que dados geológicos indicam a separação do Amazonas-Orinoco no mesmo período da conexão entre o leste e o oeste da Amazônia (grupos estruturados geneticamente). Com base no padrão evolutivo aqui obtido, podemos propor a hipótese de que as amostras da Bacia do Orinoco pertençam ao grupo genético do oeste da Amazônia, já que a separação entre essas bacias é recente quando comparada à separação de outras bacias; além disso, também é recente quando comparada ao tempo necessário para que *R. vulpinus* evidencie a mistura entre localidades distintas (leste e oeste da Amazônia).

Figura 5.1: Figura retirada de Lundberg *et al.* (1998) evidenciando as maiores características geológicas e topográficas da America do Sul, com os Escudos (Shields) e os Arcos (Arches).

Figura 5.2: Mapa hidrográfico da América do Sul evidenciando as bacias amostradas. Na Bacia Amazônica: 1) PU, 2) TBT, 3) RR, 4) AM, 5) RO, 6) PA e 7) MT (as duas últimas no Rio Xingu); na Bacia do Araguaia/Tocantins: 8) GO; e na Bacia do Paraná: 9) SP e 10) PR.

Figura 5.3: Padrão alélico e heterozigotidade em *Rhaphiodon vulpinus*.

Figura 5.4: Dendrograma não enraizado obtido pelo algoritmo Neighbor Joining a partir da distância genética de Nei (1978). Acima em destaque está o grupo Araguaia/Xingu, e abaixo destacamos o grupo da bacia do Paraná.

Figura 5.5: Proporção de mistura pela análise Bayesiana de cada amostra de *R. vulpinus*, com K=4 populações estimadas pelo Structure (em cores diferentes).

Figura 5.6: Proporção de mistura pela análise Bayesiana de cada indivíduo de *R. vulpinus* utilizado, com K=4 populações (em cores diferentes). A identidade dos exemplares é apresentada, assim como as localidades (entre parênteses): 1 = SP, 2 = PR, 3 = RO, 4 = AM, 5 = RR, 6 = PU, 7 = TBT, 8 = GO, 9 = PA, e 10 = MT.

Figura 5.7: Relação entre a distância genética (F_{st} de Slatkin) e o logaritmo natural da distância geográfica (em km) obtidas pela análise de microssatélites de *R. vulpinus*. Acima é apresentada a relação entre todas as amostras e abaixo entre amostras da região Amazônica (i.e. sem SP e PR).

Tabela 5.1: Localidades de coleta e número de indivíduos de *Rhaphiodon vulpinus* analisados (N_{micro}). Para RO, ver tabela 5.2.

Sigla	Bacia	Localidade	Coordenada	Data	N_{micro}
SP	Paraná	Rio Paraná, Jupiá, SP	20°47,97' S 51°37,94' W	12/05/2007	35
PR	Paraná	Rio Paraná, Foz do Iguaçu, PR	24°51,33' S 54°18,47' W	11/01/2011	29
RO	Amazônica	Rio Madeira		05/10/2009	36
AM	Amazônica	Rio Solimões, Careiro, AM	03°10,79' S 59°52,44' W	17/06/2008	31
RR	Amazônica	Rio Branco, Mucajaí, RR	01°55,83' N 61°00,10' W	24/01/2009	18
PU	Amazônica	Rio Itaya, Iquitos, Peru	03°45,59' S 73°15,00' W	17/11/2009	4
TBT	Amazônica	Rio Solimões, Tabatinga, AM	04°19,91' S 69°53,44' W	15/01/2010	28
GO	Araguaia/Tocantins	Rio Araguaia, Aragarças, GO	15°53,27' S 52°01,40' W	13/11/2010	22
MT	Amazônica/Xingu	Rio Culuene, Canarana, MT	13°30,76' S 53°05,80' W	16/11/2010	50
PA	Amazônica/Xingu	Rio Xingu, Vitória do Xingu, PA	02°59,40' S 51°59,40' W	30/11/2010	33

Tabela 5.2: Identificação das localidades de coleta de *R. vulpinus* na bacia do Rio Madeira (amostra RO) analisados (N_{micro}). ID = identificação dos exemplares.

localidade	Coordenadas	Posição em relação à Cachoeira do Teotônio	ID	N_{micro}
Igarapé Sotério	11°36'03.3"S, 65°13'44.7"W	Montante	71 a 73	3
Igarapé Mutumparaná	09°36'39.0"S, 64°55'36.8"W	Montante	69 e 70	2
Igarapé São Lourenço	09°21'53.3"S, 64°50'54.3"W	Montante	65 a 68	4
Igarapé Jatuarana	08°50'07.7"S, 64°02'31"W	Jusante	89 a 94	6
Igarapé Belmont	08°38'27.9"S, 63°50'59.7"W	Jusante	95	1
Lago Cuniã	08°19'37.1"S, 63°30'28.6"W	Jusante	98 e 99	2
Lago Puruzinho	07°22'10.7"S, 63°03'33.2"W	Jusante	100	1
Manicoré	05°50'50.2"S, 61°19'47.5"W	Jusante	74 a 79	6
Aripuanã	05°06'54.6"S, 60°23'24.8"W	Jusante	80 a 88	9
Lago Sampaio	03°54'44.5"S, 59°07'50"W	Jusante	96 e 97	2

Tabela 5.3: Relação dos *primers* utilizados na amplificação de 11 locos de microsatélites de *Rhaphiodon vulpinus*.

Nome do loco	Primer F	Primer R	Unidade de repetição	Alcance
Rv1	5'- ATCAAGGGGGAGGGAGAGAACA – 3'	5'- GTCCCCAGTAGAAACCAACCCA – 3'	AG	152-212
Rv2	5'- GACCTCTCAGCCATACCTGACC – 3'	5'- GTTGGCCATCTGCCCAAAGAC – 3'	TC	227-293
Rv3	5'- CAGATCCCTTTGAGGCCTTTGA – 3'	5'- ACCCGTGATAAACTGCAGGAGC – 3'	AG	126-154
Rv4	5'- TAGCAAAGCAACGCCGCTC – 3'	5'- GCATGCAAAGCACCCCTTTTTG – 3'	TC	194-222
Rv6	5'- GCTGAAACACTTTCACTGCCCA – 3'	5'- CTTCTGAGCATCAACACCTGCG – 3'	GT	175-239
Rv9	5'- TCTAAAAGGCTAAGGCATGTGA – 3'	5'- TAGAATCTTGCCACTGGGCACT – 3'	GT	243-275
Rv13	5'- GAGGCCACTAGACAATGCCAGA – 3'	5'- GGGCTCAGCTGACCTGCTTAAT – 3'	AAC	248-254
Rv16	5'- ACACCGGCTGTAATTCTTGCCA – 3'	5'- CCAGCAGAGTTTCGCTGGAATC – 3'	TC	298-334
Rv18	5'- GTCGCTGGAGTTGGAGAACAAC – 3'	5'- GTGGGCTTCAGTCAGAACTCCT – 3'	AG	107-153
Rv20	5'- TGATCCGAGCGTGGCATCTAAT – 3'	5'- ACTGTGGATGTTTCGGTGACCT – 3'	CT	364-484
Rv25	5'- GCTCCATGAGAGGACAATGACT – 3'	5'- TTATGGGATTGCCTTGTGTTGT – 3'	AATAG	235-475

Tabela 5.4: Frequências alélicas (em porcentagem) obtidas para o loco Rv1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30					
SP					10								30	1,4	8,6					4,3				2,9	24,3	17,1				1,4					
PR					24,1	1,7								22,4	10,3	8,6					6,9				8,6	12,1	3,4				1,7				
RO	6,9	1,4	1,4	6,9	9,7	2,8	1,4	2,8				1,4	1,4	2,8			13,9	6,9	5,6	4,2	5,6	11,1	1,4	6,9	4,2	1,4									
AM	1,6	4,8			4,8	8,1	3,2	6,5			1,6	1,6	3,2	1,6			8,1	4,8	1,6	12,9	8,1	11,3	4,8	1,6	1,6			1,6			1,6	1,6	3,2		
RR	2,8	2,8			11,1	5,6	8,3	5,6	2,8				2,8	5,6			16,7	5,6	13,9	5,6	2,8	2,8							2,8						
TBT	1,8	1,8			7,1	5,4	5,4	8,9	1,8	5,4	3,6	1,8			3,6	8,9	1,8			7,1	7,1	10,7	3,6	5,4				5,4				1,8	1,8		
Peru					12,5	12,5				12,5								12,5						12,5	37,5										
GO						2,3		4,5		2,3							2,3		6,8	25	6,8	18,2	18,2	2,3					4,5	4,5	2,3				
PA								3		1,5			1,5		1,5	4,5	28,8	19,7	10,6		3	13,6		4,5	6,1	1,5									
MT								1					10		14	3	2		41	3	7	8	4	1				1	1	1	3				

Tabela 5.5: Frequências alélicas (em porcentagem) obtidas para o loco Rv2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
SP									85,7	2,9					10	1,4											
PR									79,3	3,4	5,2	1,7	1,7		8,6												
RO	2,8						12,5	4,2	30,6	11,1	6,9	1,4	2,8	8,3	5,6	5,6		4,2	1,4		1,4		1,4				
AM		5		1,7		1,7	6,7	8,3	15	6,7	8,3	6,7	8,3	5	6,7	1,7		6,7	3,3		3,3				5		
RR					5,6	2,8		5,6	5,6	2,8	16,7	11,1	8,3	11,1	11,1	5,6	5,6	2,8		2,8				2,8			
TBT	1,8		1,8		1,8	3,6	16,1	1,8	5,4	10,7	10,7	3,6	3,6	8,9	5,4	8,9	1,8	5,4	1,8			1,8		1,8		1,8	1,8
Peru									12,5		50	12,5		12,5	12,5												
GO				6,8	4,5		2,3			2,3	2,3	2,3	4,5	27,3	31,8	4,5		2,3				2,3	6,8				
PA	16,7		1,5			3	4,5		4,5			1,5	9,1	9,1	30,3	13,6	3									3	
MT				2				5				13	1	4	36	18	5	5		7			1	2	1		

Tabela 5.6: Frequências alélicas (em porcentagem) obtidas para os locos Rv3 e Rv4.

	Rv3													Rv4													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
SP				64,3	17,1	18,6											2,9	1,4		11,4	58,6	1,4	24,3				
PR				62,1	15,5	22,4												1,7		24,1	32,8	1,7	29,3	5,2	5,2		
RO		16,7	5,6	12,5	16,7	18,1	6,9	4,2	4,2	11,1	2,8		1,4	1,4		5,6	2,8	15,3	13,9	41,7	9,7	9,7					
AM		4,8		3,2	17,7	25,8	17,7	17,7	6,5	4,8			1,6			6,9	8,6	19	17,2	25,9	17,2	3,4				1,7	
RR		8,3	5,6	5,6	25	22,2	11,1	2,8	5,6	8,3		5,6				11,1	2,8	30,6	25	5,6	19,4	2,8	2,8				
TBT		7,1	3,6	1,8	14,3	23,2	19,6	3,6	1,8	12,5	7,1	1,8	3,6			7,1	3,6	26,8	16,1	16,1	19,6	7,1	1,8	1,8			
Peru		12,5				50	25					12,5				12,5			25	37,5	25						
GO	11,4			13,6	36,4	15,9	9,1	6,8	4,5		2,3				2,3		6,8	15,9	6,8	45,5	4,5	6,8	9,1			2,3	
PA	1,5		1,5	4,5	62,1	6,1	9,1	4,5	9,1				1,5				7,6	24,2	31,8	24,2	6,1		4,5	1,5			
MT	18			9	38	28	4	2	1								2	26	16	47	6	1	1			1	

Tabela 5.7: Frequências alélicas (em porcentagem) obtidas para o loco Rv6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
SP			1,4			2,9		22,9		31,4			30	10	1,4												
PR			1,7			3,4		34,5		22,4			31	6,9													
RO		1,4	4,2	4,2	6,9	8,3	12,5	19,4	6,9	6,9	8,3	4,2	11,1	2,8											1,4	1,4	
AM			6,5		12,9	4,8	19,4	19,4	12,9	1,6		4,8	6,5	6,5							1,6			1,6	1,6		
RR	2,8		5,6	5,6	5,6	5,6	22,2	27,8			5,6	5,6	8,3	2,8				2,8									
TBT		1,8	5,4	5,4	5,4	5,4	17,9	19,6	1,8	7,1	1,8	8,9	7,1			1,8		1,8	1,8		1,8	1,8	1,8			1,8	
Peru			12,5		37,5		12,5	12,5		25																	
GO			11,4		2,3	13,6	4,5	6,8		2,3	15,9	15,9	2,3			2,3	2,3	2,3	15,9	2,3							
PA			4,5		1,5	39,4	31,8	6,1			4,5	3						1,5	6,1		1,5						
MT			3	7	11	9	32	2	3		10	2			1			2	17	1							

Tabela 5.8: Frequências alélicas (em porcentagem) obtidas para os locos Rv9, Rv13 e Rv16.

	Rv9													Rv13			Rv16													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
SP				4,3	25,7	45,7	18,6			1,4	1,4		2,9	48,6	37,1	14,3					64,3				35,7					
PR				5,2	53,4	36,2	5,2							60,3	31	8,6					69				31					
RO		1,4			22,2	40,3	26,4	8,3					1,4	44,4	26,4	29,2			4,2	4,2	66,7	4,2			13,9	4,2			1,4	1,4
AM	4,8				32,3	45,2	8,1	8,1		1,6				38,7	25,8	35,5	1,7	5,2	6,9	10,3	53,4	3,4	3,4		5,2	3,4		3,4	1,7	1,7
RR		2,8			33,3	44,4	5,6	11,1	2,8					44,4	19,4	36,1			5,6	13,9	44,4	11,1			13,9	5,6	2,8			2,8
TBT	8,9	1,8			33,9	32,1	19,6	3,6						32,1	28,6	39,3	1,8	1,8	1,8	10,7	48,2	5,4	1,8		17,9	5,4	1,8	3,6		
Peru					37,5	37,5	25							37,5	25	37,5			25	12,5	37,5				12,5	12,5				
GO		2,4	2,4		35,7	50	7,1		2,4					9,1	20,5	70,5			4,5		34,1			6,8	27,3	22,7	4,5			
PA		1,5			47	47	1,5		1,5			1,5		19,7	27,3	53					33,3			3	53	6,1	4,5			
MT		2			47	40	10		1					9	3	88					72			1	18	6	3			

Tabela 5.9: Frequências alélicas (em porcentagem) obtidas para o loco Rv18.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
SP				91,4			8,6										
PR				94,8		1,7	1,7	1,7									
RO	1,4			33,3	2,8	11,1	18,1	11,1	9,7	1,4	8,3	2,8					
AM		1,6	1,6	6,5	3,2	6,5	21	14,5	9,7	11,3	11,3		4,8		1,6	3,2	3,2
RR			2,8	8,3	2,8	5,6	19,4	11,1	13,9	16,7	5,6	5,6	5,6		2,8		
TBT	1,8		3,6	8,9	5,4	3,6	19,6	16,1	16,1	7,1	10,7	3,6	1,8	1,8			
Peru					12,5	12,5	25	25	25								
GO			15,9	6,8		2,3	34,1	34,1	2,3		4,5						
PA			4,5	6,1		1,5	31,8	36,4	9,1	4,5	1,5	3	1,5				
MT			6	7			17	18		51	1						

Tabela 5.10: Frequências alélicas (em porcentagem) obtidas para o loco Rv20.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
SP					7,1		40	1,4	51,4																							
PR					24,1		31	1,7	41,4					1,7																		
RO			2,8	4,2	31,9		36,1	5,6	5,6	1,4	4,2	1,4			1,4				1,4	1,4		1,4		1,4								
AM		1,6		8,1	29		22,6	11,3	4,8	1,6	1,6	3,2	3,2		3,2	1,6	1,6								1,6				1,6	1,6	1,6	
RR	2,8		2,8	5,6	16,7		41,7	11,1	5,6			5,6	2,8									2,8		2,8								
TBT				17,9	41,1		23,2	3,6	1,8		1,8	1,8	1,8					1,8		1,8		1,8										1,8
Peru					25		62,5					12,5																				
GO				11,4	11,4		25	6,8		2,3	2,3				2,3		2,3	6,8	4,5	6,8	2,3	2,3	6,8		2,3	2,3		2,3				
PA		1,5	1,5	22,7	27,3		7,6			3			4,5				1,5		3	10,6	3	1,5	10,6	1,5								
MT			1	8	1	62			3	12	2									3	2		2					3	1			

Tabela 5.11: Frequências alélicas (em porcentagem) obtidas para o loco Rv25.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
SP					38,2	58,8									2,9																
PR					46,6	50	3,4																								
RO		3,3		5	20	10	5	11,7	3,3		5	3,3	1,7	6,7				10	3,3	5			1,7	1,7	1,7				1,7		
AM		3,4			15,5	20,7	6,9	10,3		1,7	6,9			6,9				1,7		1,7		1,7	1,7	5,2	6,9	5,2				1,7	1,7
RR				11,1	13,9	8,3	2,8	16,7				2,8		2,8	2,8			2,8	11,1	5,6			2,8	5,6	8,3					2,8	
TBT	6	6		4	16	20	12	2				2						8	4	12		4		2				2			
Peru						12,5	25	12,5		12,5	12,5			12,5											12,5						
GO	2,8				2,8	25	11,1	5,6							5,6		2,8	5,6		5,6	5,6	5,6		11,1	11,1						
PA		1,7	3,3	3,3	8,3	11,7	15	3,3		3,3		1,7			3,3		1,7	8,3				23,3	1,7	5		1,7		3,3			
MT				2,1		6,4	12,8	3,2								1,1		10,6				10,6	3,2		5,3	33	11,7				

Tabela 5.12: Número e riqueza alélica total (Na e Rt), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), probabilidade de Hardy-Weinberg (HW) e índices de endogamia obtidos em 11 locos de microsátélites de *R. vulpinus*. Em negrito são destacados os valores significativos.

	Rv1	Rv2	Rv3	Rv4	Rv6	Rv9	Rv13	Rv16	Rv18	Rv20	Rv25	Total
Na	30	27	13	14	26	13	3	14	17	32	31	
Rt	6.435	5.622	4.810	4.646	5.876	3.277	2.834	3.321	4.827	4.684	5.779	
Ho	0.849	0.745	0.733	0.708	0.838	0.616	0.537	0.583	0.664	0.689	0.844	0.710
Ht'	0.944	0.900	0.850	0.833	0.912	0.674	0.662	0.670	0.862	0.803	0.907	0.820
HW	0.3902	0.5452	0.4798	HS	0.6691	HS	0.9638	0.2318	0.0487	0.0930	0.7654	HS
Fit	0.0967	0.1873	0.1321	0.1605	0.0767	0.1130	0.2215	0.1290	0.2707	0.1692	0.0882	0.1485
Rit	0.1279	0.1627	0.2455	0.2724	0.0077	0.2164	0.2990	0.1889	0.3967	0.1406	0.3060	0.2009
Fst	0.0677	0.1711	0.1267	0.0957	0.0834	0.0187	0.1708	0.0697	0.2361	0.0904	0.1056	0.1140
Rst	0.1202	0.1287	0.1496	0.2462	0.0450	0.0389	0.2545	0.0818	0.3700	0.0949	0.3330	0.1931
Dst'	0.057	0.143	0.105	0.066	0.069	0.004	0.077	0.040	0.177	0.060	0.077	0.080
Gst'	0.060	0.159	0.123	0.079	0.076	0.006	0.117	0.060	0.205	0.075	0.084	0.097
Fis	0.0310	0.0195	0.0062	0.0717	-0.0073	0.0961	0.0612	0.0637	0.0453	0.0866	-0.0194	0.0390
Ris	0.0087	0.0390	0.1128	0.0347	-0.0391	0.1847	0.0597	0.1166	0.0423	0.0505	-0.0405	0.0097
Gis	0.042	0.017	0.017	0.077	0.005	0.081	0.081	0.075	0.031	0.072	-0.016	0.041

Tabela 5.13: Diversidade gênica (DivG), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), probabilidade de Hardy-Weinberg (HW), índices de endogamia (Fis e Ris) e as probabilidades dos testes de gargalo *Sign test* (ST) e *Wilcoxon sign-rank test* (W-SRT) obtidos para cada amostra de *R. vulpinus* utilizando 11 locos de microsatélites.

	DivG	Ho	He	HW	Fis	Ris	ST	W-SRT
Rio Paraná, SP	0,541	0,521	0,544	HS	0.0429	0.0288	0,43	0,33
Rio Paraná, PR	0,560	0,536	0,560	0.4400	0.0443	0.0978	0,09	0,32
Rio Madeira, RO	0,774	0,760	0,800	0.0991	0.0531	0.0393	0,27	0,64
Rio Amazonas, AM	0,800	0,815	0,834	0.5513	0.0238	-0.0252	0,11	0,32
Rio Branco, RR	0,833	0,808	0,833	0.6516	0.0313	0.0863	0,54	0,70
Rio Itaya, Peru	0,812	0,773	0,812	0.9997	0.0556	0.2115	0,49	0,83
Rio Solimões, AM-TBT	0,821	0,778	0,838	0.3837	0.0731	-0.0241	0,32	0,70
Rio Araguaia, GO	0,749	0,736	0,782	0.1667	0.0604	-0.0121	0,47	0,36
Rio Xingu, PA	0,724	0,710	0,739	0.0383	0.0402	0.1012	0,01	0,10
Rio Xingu, MT	0,652	0,659	0,661	0.0866	0.0029	-0.0785	0,11	0,07

Tabela 5.14: Riqueza alélica, heterozigosidade observada (Ho) e esperada (Hs) e as probabilidades dos testes de gargalo *Sign test* (ST) e *Wilcoxon sign-rank test* (W-SRT) obtidos para cada grupo genético de *R. vulpinus* utilizando 11 locos de microsatélites.

	Riqueza Alélica	Ho	Hs	ST	W-SRT
Paraná	2,822	0,528	0,552	0,55	0,70
Oeste da Amazônia	4,918	0,786	0,824	0,51	0,90
Leste da Amazônia	4,146	0,691	0,711	0,04	0,01

Tabela 5.15: Índices de diversidade intra amostral em 11 locos de microsstatélites de *R. vulpinus*. Número amostral (N), número de alelos (Na), número de alelos restritos (Np), diversidade gênica (DivG), riqueza alélica (RiqA), heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho).

	N	Rv1	Rv2	Rv3	Rv4	Rv6	Rv9	Rv13	Rv16	Rv18	Rv20	Rv25
Rio Paraná, SP	35											
Na/Np	9	4	3	6	7	7/1	3	2	2	4	3	
DivG	0.814	0.258	0.530	0.595	0.757	0.699	0.616	0.465	0.160	0.579	0.513	
RiqA	4.531	1.921	2.622	2.993	3.837	3.495	2.707	1.977	1.531	2.565	2.207	
He	0.813	0.258	0.530	0.592	0.758	0.697	0.614	0.466	0.159	0.578	0.514	
Ho	0.743	0.229	0.571	0.371	0.886	0.600	0.543	0.543	0.114	0.543	0.588	
Rio Paraná, PR	29											
Na/Np	10	6	3	7/1	6	4	3	2	4	5/1	3	
DivG	0.860	0.365	0.550	0.756	0.741	0.590	0.542	0.435	0.102	0.690	0.541	
RiqA	5.137	2.437	2.652	3.831	3.676	2.708	2.497	1.960	1.414	3.134	2.253	
He	0.860	0.365	0.550	0.756	0.741	0.588	0.541	0.435	0.102	0.685	0.541	
Ho	0.862	0.414	0.552	0.759	0.724	0.483	0.517	0.483	0.103	0.448	0.552	
Rio Madeira, RO	36											
Na/Np	21/1	15	11	8/1	15	6	3	8	10	14	18/2	
DivG	0.939	0.867	0.884	0.773	0.913	0.723	0.657	0.537	0.827	0.768	0.920	
RiqA	6.525	5.472	5.456	4.323	6.001	3.538	2.866	3.145	4.787	4.297	6.224	
He	0.939	0.867	0.884	0.772	0.912	0.721	0.657	0.536	0.825	0.766	0.921	
Ho	0.944	0.833	0.889	0.694	0.861	0.639	0.667	0.472	0.694	0.667	1.000	
Rio Amazonas, AM	31											
Na/Np	23	17/1	9	8/1	13/1	6	3	12	14/3	17/4	17/1	
DivG	0.947	0.942	0.842	0.837	0.888	0.688	0.671	0.700	0.900	0.852	0.910	
RiqA	6.696	6.512	4.852	4.758	5.571	3.455	2.886	4.242	5.791	5.222	6.019	
He	0.947	0.939	0.842	0.838	0.888	0.687	0.668	0.700	0.900	0.851	0.910	
Ho	0.935	0.800	0.871	0.896	0.903	0.677	0.516	0.724	0.903	0.806	0.931	
Rio Branco, RR	18											
Na/Np	17	15/1	10	8	12/1	6	3	8	12	11/1	15	
DivG	0.938	0.933	0.877	0.810	0.869	0.694	0.649	0.768	0.910	0.797	0.930	
RiqA	6.517	6.416	5.381	4.468	5.454	3.468	2.838	4.371	5.864	4.763	6.289	
He	0.938	0.935	0.873	0.811	0.870	0.694	0.652	0.765	0.906	0.795	0.928	
Ho	0.944	1.000	0.722	0.833	0.889	0.667	0.778	0.667	0.778	0.722	0.889	
Rio Itaya, Peru	4											
Na/Np	6	5	4	4	5	3	3	5	5	3	7	
DivG	0.917	0.792	0.750	0.833	0.875	0.750	0.792	0.875	0.875	0.583	0.958	
RiqA	6.000	5.000	4.000	4.000	5.000	3.000	3.000	5.000	5.000	3.000	7.000	
He	0.893	0.786	0.750	0.821	0.857	0.750	0.750	0.857	0.893	0.607	0.964	
Ho	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.500	0.750	1.000	0.750	1.000	
Rio Solimões, AM	28											
Na/Np	21/1	21/1	12	9	19/2	6	3	11	13/1	12/1	14	
DivG	0.954	0.937	0.873	0.844	0.913	0.747	0.675	0.731	0.894	0.757	0.905	
RiqA	6.819	6.485	5.335	4.832	6.090	3.749	2.899	4.169	5.657	4.115	5.851	
He	0.954	0.936	0.872	0.841	0.913	0.747	0.673	0.728	0.893	0.755	0.904	
Ho	0.964	0.928	0.821	0.678	0.928	0.750	0.536	0.571	0.893	0.643	0.840	
Rio Araguaia, GO	22											
Na/Np	13	13	8	9/1	14/1	6/1	3	6	7	17/2	13/1	
DivG	0.876	0.824	0.814	0.765	0.904	0.632	0.463	0.768	0.753	0.907	0.905	
RiqA	5.413	4.922	4.684	4.424	5.791	3.030	2.433	3.943	3.892	6.041	5.951	
He	0.873	0.824	0.814	0.760	0.903	0.631	0.464	0.766	0.751	0.907	0.905	
Ho	0.773	0.864	0.818	0.545	0.864	0.571	0.500	0.682	0.682	0.909	0.889	
Rio Xingu, PA	33											
Na/Np	13	12	9	7	10	6/1	3	5	10	14	17/3	
DivG	0.851	0.852	0.598	0.780	0.741	0.568	0.616	0.612	0.760	0.854	0.900	
RiqA	5.123	5.146	3.535	4.121	4.016	2.477	2.779	2.934	4.152	5.158	5.877	
He	0.851	0.851	0.598	0.781	0.742	0.566	0.615	0.610	0.760	0.853	0.900	
Ho	0.818	0.788	0.576	0.848	0.757	0.485	0.576	0.515	0.788	0.757	0.900	
Rio Xingu, MT	50											
Na/Np	15	13/1	7	8	13	5	3	5	6	12/2	11/1	
DivG	0.794	0.814	0.742	0.688	0.839	0.616	0.219	0.449	0.677	0.596	0.838	
RiqA	4.751	4.800	3.791	3.476	5.018	2.799	1.767	2.514	3.529	3.527	5.017	
He	0.794	0.814	0.742	0.688	0.839	0.615	0.219	0.449	0.677	0.596	0.838	
Ho	0.760	0.840	0.760	0.700	0.820	0.540	0.240	0.420	0.680	0.640	0.851	

Tabela 5.16: Probabilidade de Hardy-Weinberg (HW) e índices de endogamia intra amostral em 11 locos de microsatélites de *R. vulpinus*. Fis refere-se a Weir & Cockerham (1984) e Ris refere-se a Weir (1984) Em negrito estão os valores significantes após a correção Bonferroni.

	Rv1	Rv2	Rv3	Rv4	Rv6	Rv9	Rv13	Rv16	Rv18	Rv20	Rv25
Rio Paraná, SP											
HW	0.6122	0.0462	0.8834	0.0000	0.2774	0.0000	0.3073	0.4656	0.2075	0.0067	0.4713
Fis – W&C	0,0872	0,1154	-0,078	0,3761	-0,170	0,1413	0,1181	-0,168	0,2842	0,0624	-0,145
Ris	0.0090	-0.118	0.0000	0.3481	-0.142	0.7834	-0.103	-0.168	0.2842	0.2289	0.0526
Rio Paraná, PR											
HW	0.3932	1.0000	0.8182	0.2158	0.1752	0.0357	1.0000	0.6812	1.0000	0.0478	1.0000
Fis – W&C	-0,002	-0,135	-0,003	-0,004	0,0233	0,1816	0,0455	-0,110	-0,018	0,3500	-0,019
Ris	0.1713	-0.172	0.0896	-0.183	-0.065	0.4766	0.0372	-0.110	-0.033	0.3261	-0.025
Rio Madeira, RO											
HW	0.1738	0.1097	0.2263	0.0405	0.6175	0.7383	1.0000	0.3088	0.1462	0.0799	0.6946
Fis – W&C	-0,005	0,0393	-0,005	0,1012	0,0565	0,1159	-0,015	0,1211	0,1599	0,1318	-0,086
Ris	0.0630	-0.124	0.0619	0.2440	0.0784	-0.023	0.0203	0.1073	0.1722	-0.149	0.0991
Rio Amazonas, AM											
HW	0.4239	0.0835	0.1708	0.8870	0.3714	0.4207	0.2869	0.7612	0.8245	0.7390	0.3158
Fis – W&C	0,0125	0,1507	-0,034	-0,070	-0,017	0,0149	0,2308	-0,035	-0,003	0,0536	-0,023
Ris	0.0767	0.0406	-0.052	-0.176	-0.525	-0.030	0.2751	0.3428	0.1602	0.3323	-0.258
Rio Branco, RR											
HW	0.9200	0.9434	0.0288	0.9168	0.9167	0.7736	0.5601	0.5452	0.0315	0.9421	0.5346
Fis – W&C	-0,007	-0,071	0,1769	-0,028	-0,022	0,0400	-0,199	0,1319	0,1454	0,0943	0,0439
Ris	-0.102	0.2540	0.4322	0.0086	-0.014	0.2056	-0.190	0.0265	0.1329	0.0353	0.1720
Rio Itaya, Peru											
HW	0.4278	0.7829	1.0000	0.7739	0.6597	0.6529	0.6582	0.6514	1.0000	1.0000	1.0000
Fis – W&C	0,1818	0,0526	0,0000	0,1000	0,1429	0,0000	0,3684	0,1429	-0,142	-0,285	-0,043
Ris	-0.078	0.2747	-0.050	-0.578	0.1615	0.5000	0.7391	0.2632	0.0625	0.1391	0.5558
Rio Solimões, AM											
HW	0.8128	0.8713	0.6993	0.0083	0.4385	0.7828	0.4618	0.1397	0.5933	0.3066	0.5177
Fis – W&C	-0,011	0,0085	0,0591	0,1959	-0,017	-0,004	0,2067	0,2188	0,0007	0,1511	0,0718
Ris	-0.135	0.0201	0.2192	0.0630	0.1086	0.0967	0.2616	0.2276	-0.237	-0.074	-0.036
Rio Araguaia, GO											
HW	0.2676	0.9874	0.8145	0.0484	0.7628	0.3294	0.4505	0.0365	0.0372	0.5695	0.7926
Fis – W&C	0,1174	-0,048	-0,005	0,2871	0,0443	0,0960	-0,079	0,1127	0,0948	-0,002	0,0181
Ris	-0.020	-0.073	0.3039	0.1748	0.0002	0.2389	0.1008	0.0371	-0.374	0.1607	-0.203
Rio Xingu, PA											
HW	0.0608	0.4445	0.4737	0.4417	0.2132	0.0589	0.8877	0.6571	0.0208	0.2094	0.1364
Fis – W&C	0,0389	0,0750	0,0380	-0,087	-0,021	0,1460	0,0646	0,1579	-0,036	0,1131	0,0000
Ris	-0.037	0.1322	-0.028	0.0051	0.1438	-0.582	0.0318	0.2744	-0.078	0.0746	0.1537
Rio Xingu, MT											
HW	0.2813	0.7494	0.2484	0.2181	0.4796	0.0076	1.0000	0.0612	0.3963	0.8850	0.1626
Fis – W&C	0,0429	-0,032	-0,0245	-0,0169	0,0226	0,1227	-0,0980	0,0654	-0,0048	-0,0736	-0,0157
Ris	-0.0204	0.0934	-0.0071	-0.0665	-0.0422	0.2875	-0.1175	0.0812	0.1362	-0.1822	-0.1247

Tabela 5.17: Valores significantes do teste de desequilíbrio de ligação. Em negrito estão os valores significantes após a correção Bonferroni.

Pop	Locos	P-Value
SP	Rv1 e Rv16	0.048970
	Rv3 e Rv16	0.004710
PR	Rv3 e Rv13	0.003890
AM	Rv3 e Rv16	0.049360
RR	Rv3 e Rv20	0.032360
RO	Rv2 e Rv3	0.044560
	Rv2 e Rv4	0.000000
	Rv3 e Rv6	0.006880
	Rv4 e Rv6	0.000000
	Rv2 e Rv13	0.007720
	Rv3 e Rv13	0.003750
	Rv2 e Rv16	0.019840
	Rv4 e Rv16	0.000000
	Rv2 e Rv18	0.004820
	Rv3 e Rv18	0.006910
	Rv6 e Rv18	0.044260
	Rv4 e Rv20	0.022950
TBT	Rv16 e Rv18	0.000650
GO	Rv2 e Rv4	0.022150
	Rv1 e Rv6	0.013210
	Rv4 e Rv18	0.038780
MT	Rv1 e Rv2	0.005890
	Rv4 e Rv13	0.002960
	Rv1 e Rv20	0.004080
	Rv3 e Rv25	0.043000
PA	Rv4 e Rv18	0.017310
	Rv13 e Rv18	0.019580
	Rv9 e Rv25	0.001550
Todas	Rv2 e Rv4	HS
	Rv4 e Rv6	HS
	Rv4 e Rv16	HS
	Rv3 e Rv13	0.036034
	Rv3 e Rv16	0.036923

Tabela 5.18: Diferenciação genotípica dos locos Rv1 (acima) e Rv2 (abaixo) entre pares de amostras. Em destaque estão os valores significativos, e em negrito os valores não significantes após a correção de Bonferroni.

	SP	PR	RO	AM	RR	TBT	GO	PA	MT
SP	-	0.015	0	0	0	0	0	0	0
PR	0.370	-	0	0	0	0	0	0	0
RO	0	0	-	0.417	0.365	0.084	0	0	0
AM	0	0	0.134	-	0.467	0.953	0.009	0	0
RR	0	0	0	0.261	-	0.493	0.003	0	0
TBT	0	0	0.231	0.278	0.390	-	0	0	0
GO	0	0	0	0	0.007	0	-	0	0
PA	0	0	0	0	0	0	0	-	0
MT	0	0	0	0	0.001	0	0	0	-

Tabela 5.19: Diferenciação genotípica dos locos Rv3 (acima) e Rv4 (abaixo) entre pares de amostras. Em destaque estão os valores significativos, e em negrito os valores não significantes após a correção de Bonferroni.

	SP	PR	RO	AM	RR	TBT	GO	PA	MT
SP	-	0.866	0	0	0	0	0	0	0
PR	0.014	-	0	0	0	0	0	0	0
RO	0	0	-	0.004	0.609	0.157	0	0	0
AM	0	0	0.232	-	0.171	0.052	0.002	0	0
RR	0	0	0.001	0.154	-	0.658	0.025	0.003	0
TBT	0	0	0.107	0.684	0.846	-	0	0	0
GO	0	0	0.085	0.009	0	0.012	-	0.062	0.184
PA	0	0	0	0.006	0.004	0.007	0.007	-	0
MT	0	0	0.016	0.001	0	0	0.093	0.016	-

Tabela 5.20: Diferenciação genotípica dos locos Rv6 (acima) e Rv9 (abaixo) entre pares de amostras. Em destaque estão os valores significativos, e em negrito os valores não significantes após a correção de Bonferroni.

	SP	PR	RO	AM	RR	TBT	GO	PA	MT
SP	-	0.799	0	0	0	0	0	0	0
PR	0.018	-	0	0	0	0	0	0	0
RO	0.036	0	-	0.158	0.577	0.739	0	0	0
AM	0.008	0.005	0.027	-	0.096	0.066	0	0	0
RR	0.008	0.017	0.112	0.488	-	0.939	0.002	0	0
TBT	0.007	0.002	0.057	0.250	0.059	-	0.007	0	0
GO	0.105	0.198	0.011	0.118	0.490	0.040	-	0	0
PA	0	0.207	0	0.008	0.110	0	0.745	-	0
MT	0.004	0.156	0	0.003	0.035	0.004	0.654	0.284	-

Tabela 5.21: Diferenciação genotípica dos locos Rv13 (acima) e Rv16 (abaixo) entre pares de amostras. Em destaque estão os valores significativos, e em negrito os valores não significantes após a correção de Bonferroni.

	SP	PR	RO	AM	RR	TBT	GO	PA	MT
SP	-	0.393	0.089	0.033	0.027	0.012	0	0	0
PR	0.690	-	0.012	0.003	0.004	0	0	0	0
RO	0	0.002	-	0.729	0.634	0.370	0	0.005	0
AM	0	0	0.164	-	0.762	0.835	0.001	0.066	0
RR	0	0	0.428	0.471	-	0.457	0	0.028	0
TBT	0	0	0.294	0.700	0.903	-	0.007	0.274	0
GO	0	0	0	0	0.004	0.003	-	0.139	0.004
PA	0	0	0	0	0	0	0.030	-	0
MT	0.008	0.046	0.008	0	0	0.001	0.001	0	-

Tabela 5.22: Diferenciação genotípica dos locos Rv18 (acima) e Rv20 (abaixo) entre pares de amostras. Em destaque estão os valores significativos, e em negrito os valores não significantes após a correção de Bonferroni.

	SP	PR	RO	AM	RR	TBT	GO	PA	MT
SP	-	0.096	0	0	0	0	0	0	0
PR	0.100	-	0	0	0	0	0	0	0
RO	0	0	-	0.001	0.023	0.050	0	0	0
AM	0	0	0.489	-	0.891	0.620	0.001	0.005	0
RR	0	0	0.523	0.822	-	0.956	0.003	0.132	0
TBT	0	0	0.258	0.512	0.151	-	0.005	0.097	0
GO	0	0	0.018	0.010	0.045	0.020	-	0.326	0
PA	0	0	0.007	0.001	0.041	0	0.299	-	0
MT	0	0	0	0	0	0	0	0	-

Tabela 5.23: Diferenciação genotípica do loco Rv25 (acima) e todos os locos combinados (abaixo) entre pares de amostras. Em destaque estão os valores significativos, e em negrito os valores não significantes após a correção de Bonferroni.

	SP	PR	RO	AM	RR	TBT	GO	PA	MT
SP	-	0.112	0	0	0	0	0	0	0
PR	0.0035	-	0	0	0	0	0	0	0
RO	0	0	-	0.091	0.624	0.062	0	0	0
AM	0	0	0.0001	-	0.107	0.001	0.017	0	0
RR	0	0	0.0004	0.3098	-	0.011	0.004	0	0
TBT	0	0	0.0081	0.0488	0.3008	-	0.001	0.007	0
GO	0	0	0	0	0	0	-	0.002	0
PA	0	0	0	0	0	0	0	-	0
MT	0	0	0	0	0	0	0	0	-

Tabela 5.24: Valores de Fst (abaixo) e Rst (acima) encontrados entre as amostras de *R. vulpinus*, com destaque para os valores significativos. Em negrito estão aqueles valores não significativos após a correção de Bonferroni.

	SP	PR	RO	AM	RR	TBT	GO	PA	MT
SP	-	0.06420	0.18433	0.22105	0.32679	0.17693	0.34926	0.29411	0.48998
PR	0.01665	-	0.15893	0.21920	0.30224	0.16179	0.39391	0.33951	0.51201
RO	0.13571	0.11390	-	0.00970	0.00253	0.00171	0.19116	0.13356	0.24161
AM	0.17477	0.15227	0.01103	-	-0.00719	-0.00039	0.10160	0.06428	0.15878
RR	0.18822	0.16765	0.01826	0.00039	-	0.00401	0.14731	0.10700	0.17648
TBT	0.18232	0.16028	0.01384	-0.00041	0.00303	-	0.15096	0.11691	0.22516
GO	0.23570	0.21915	0.06409	0.04347	0.04840	0.04547	-	0.03170	0.09685
PA	0.24659	0.22960	0.08075	0.06151	0.05170	0.05835	0.03489	-	0.13367
MT	0.27830	0.26167	0.10552	0.08922	0.08611	0.09560	0.05957	0.08969	-

Tabela 5.25: Valores mínimos, máximos e médios de Fst e Rst encontrados intra e inter grupos de amostras de *R. vulpinus*.

		Bacia do Paraná (P)	Oeste da Amazônia (OA)	Leste da Amazônia (LA)	Entre P e OA	Entre P e LA	Entre OA e LA
Mínimo	Fst	0,017	0,000	0,035	0,114	0,219	0,043
	Rst	0,064	-0,007	0,032	0,159	0,294	0,064
Máximo	Fst	0,017	0,018	0,090	0,188	0,278	0,106
	Rst	0,064	0,010	0,134	0,327	0,512	0,242
Médio	Fst	0,017	0,008	0,061	0,159	0,245	0,069
	Rst	0,064	0,002	0,087	0,219	0,396	0,151

Tabela 5.26: Análise de variância molecular (AMOVA) com dois agrupamentos testados.

	Variação	g.l.	Componentes da variância	Porcentagem do total	P *	ϕ
3 grupos: Araguaia + Xingu; Amazônica, Paraná	Entre grupos	2	0,46802 Va	11,33	0	0,11327
	Entre amostras do mesmo grupo	7	0,12081 Vb	2,92	0	0,03297
	Entre amostras	562	3,54289 Vc	85,75	0	0,14251
4 grupos: Araguaia + baixo Xingu; Alto Xingu; Amazônica, Paraná	Entre grupos	3	0,49749 Va	12,13	0,00098	0,12129
	Entre amostras do mesmo grupo	6	0,06134 Vb	1,50	0	0,01702
	Entre amostras	562	3,54289 Vc	86,38	0	0,13624

Tabela 5.27: Análise de variância molecular (AMOVA) de cada loco, com dois agrupamentos testados. Em destaque, apresentamos os valores não significantes.

	Entre grupos				Entre amostras do mesmo grupo				Entre amostras			
	Va	Varição (%)	FCT	P	Vb	Varição (%)	FSC	P	Vc	Varição (%)	FST	P
3 grupos												
Rv1	0.02707	5.66799	0.05668	0.00196	0.01226	2.56785	0.02722	0.00000	0.43819	91.76416	0.08236	0.00000
Rv2	0.09289	19.60588	0.19606	0.00098	0.00883	1.86386	0.02318	0.00000	0.37205	78.53027	0.21470	0.00000
Rv3	0.06116	13.98426	0.13984	0.00098	0.00856	1.95845	0.02277	0.00000	0.36761	84.05729	0.15943	0.00000
Rv4	0.03823	8.98521	0.08985	0.01075	0.01219	2.86512	0.03148	0.00000	0.37501	88.14967	0.11850	0.00000
Rv6	0.03779	8.10200	0.08102	0.00000	0.01029	2.20534	0.02400	0.00000	0.41835	89.69266	0.10307	0.00000
Rv9	0.00323	0.95724	0.00957	0.20919	0.00449	1.33297	0.01346	0.07234	0.32940	97.70979	0.02290	0.00587
Rv13	0.06644	19.10002	0.19100	0.00196	0.00797	2.29037	0.02831	0.00684	0.27344	78.60961	0.21390	0.00000
Rv16	0.00532	1.68923	0.01689	0.18280	0.01829	5.81075	0.05911	0.00000	0.29111	92.50002	0.07500	0.00000
Rv18	0.10622	23.34134	0.23341	0.00489	0.02316	5.08968	0.06639	0.00000	0.32569	71.56897	0.28431	0.00000
Rv20	0.02996	7.27175	0.07272	0.00196	0.01514	3.67448	0.03963	0.00000	0.36694	89.05377	0.10946	0.00000
Rv25	0.05003	10.78585	0.10786	0.00000	0.01049	2.26114	0.02535	0.00000	0.40331	86.95301	0.13047	0.00000
4 grupos												
Rv1	0.03122	6.55547	0.06555	0.00000	0.00684	1.43626	0.01537	0.00098	0.43819	92.00827	0.07992	0.00000
Rv2	0.08469	18.21016	0.18210	0.00782	0.00835	1.79514	0.02195	0.00098	0.37205	79.99469	0.20005	0.00000
Rv3	0.05930	13.71693	0.13717	0.00196	0.00541	1.25206	0.01451	0.01564	0.36761	85.03101	0.14969	0.00000
Rv4	0.03248	7.70879	0.07709	0.03128	0.01390	3.29771	0.03573	0.00000	0.37501	88.99350	0.11007	0.00000
Rv6	0.03786	8.16621	0.08166	0.00000	0.00736	1.58715	0.01728	0.00196	0.41835	90.24664	0.09753	0.00000
Rv9	0.00143	0.42387	0.00424	0.39883	0.00571	1.69583	0.01703	0.05572	0.32940	97.88030	0.02120	0.00782
Rv13	0.07063	20.55662	0.20557	0.00000	-0.00048	-0.13996	-0.00176	0.69990	0.27344	79.58334	0.20417	0.00000
Rv16	0.02131	6.71510	0.06715	0.00587	0.00490	1.54494	0.01656	0.07918	0.29111	91.73996	0.08260	0.00000
Rv18	0.11964	26.61214	0.26612	0.00098	0.00422	0.93952	0.01280	0.07331	0.32569	72.44834	0.27552	0.00000
Rv20	0.03909	9.49831	0.09498	0.00391	0.00548	1.33118	0.01471	0.06354	0.36694	89.17051	0.10829	0.00000
Rv25	0.05286	11.47410	0.11474	0.00000	0.00452	0.98141	0.01109	0.02835	0.40331	87.54449	0.12456	0.00000

Capítulo 6 - Discussão geral e conclusões

A presente tese constitui a realização de um projeto idealizado pela professora do Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo, Dra. Monica de Toledo Piza Ragazzo, com o intuito de testar o monofiletismo de Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes (1998) e também de avaliar a estrutura genética de *Rhaphiodon vulpinus* (a única espécie amplamente distribuída e que ocorre na Bacia do Paraná). Por isso, a tese está dividida em capítulos que resultarão em quatro artigos relacionados a esse projeto, que tem como objetivo contribuir para o conhecimento acerca da evolução dos peixes Neotropicais, com ênfase nas espécies de Cynodontidae *sensu* Lucena & Menezes (1998).

O projeto começou em 2008, quando a hipótese de Lucena & Menezes (1998) era a mais recente e aceita para as relações da família Cynodontidae; composta, segundo os autores, pelas subfamílias Cynodontinae e Roestinae e com *Acestrorhynchus* como grupo relacionado. As relações filogenéticas entre as espécies de *Acestrorhynchus* tinham sido obtidas por Pretti (2007) (publicada em Pretti *et al.*, 2009) utilizando os genes mitocondriais 16S e ATPase e o primeiro íntron da RPS7 e por isso essas regiões gênicas foram escolhidas também para o projeto de Cynodontidae.

Entretanto, o projeto sobre as relações filogenéticas de Characinae de Mattox (2010) sob a orientação de Toledo-Piza, já estava em andamento e indicava o não monofiletismo de Cynodontidae, o que foi averiguado logo nas primeiras análises moleculares (Garcez *et al.*, 2009), levando à necessidade de incluir espécimes de diferentes famílias, a fim de tentar estabelecer as relações filogenéticas de cada subfamília com outros Characiformes. Nesta etapa, dois trabalhos auxiliaram na escolha dos grupos relacionados à Roestinae (Mattox, 2010) e à Cynodontinae (Calcagnotto *et al.*, 2005).

Os resultados foram então apresentados à comunidade científica internacional durante o *Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists* realizado em Providence (EUA) em 2010, no trabalho “Phylogenetic relationships of the Cynodontidae (Teleostei, Characiformes) based on mitochondrial and nuclear gene sequences”, que ganhou o prêmio “Best student presentation” da Neotropical Ichthyology Association (Garcez *et al.*,

2010). O trabalho apresentava o não monofiletismo de Cynodontinae e também o monofiletismo das subfamílias e as suas relações com outros Characiformes, com Roestinae relacionada à Heterocharacinae e *Acestrorhynchus* (dentro de Characidae) e com Cynodontinae relacionada às famílias Prochilodontidae, Parodontidae, Hemiodontidae e Serrasalminidae.

Após a apresentação destes resultados preliminares, Oliveira *et al.* (2011) decidiram incluir representantes tanto de Roestinae quanto de Cynodontinae em seu projeto em andamento acerca das relações filogenéticas de Characidae. O trabalho recém publicado encontrou as mesmas relações já obtidas por mim e forneceu novas fontes de dados para a maioria dos táxons utilizados, o que se mostrou essencial para o esclarecimento de algumas relações filogenéticas, especialmente após a inclusão de táxons filogeneticamente mais distantes (i.g. a família africana Distichodontidae).

Novas fontes de dados foram necessárias principalmente porque a inclusão de 12 das 18 famílias de Characiformes reconhecidas por Nelson (2006) resultou em um alinhamento do íntron S7 com muitos *indels* de tamanhos variados, dificultando a recuperação dos caracteres homólogos. Entretanto, a simples exclusão desta região nuclear não era uma alternativa viável devido à baixa resolução da árvore mitocondrial. Por isso, apesar do artigo de Oliveira *et al.* (2011) ter saído em outubro de 2011, as sequências dos genes *cytb*, *rag2* e *myh6* disponíveis no GenBank foram incorporadas à tese, entretanto nem todos os arquivos de dados estavam disponíveis até a data da análise final.

As sequências obtidas no GenBank foram conferidas através de uma análise filogenética e somente aquelas que constituíram grupos monofiléticos com outras do gênero ou com grupos reconhecidamente relacionados foram incluídas. Recomendamos este procedimento no caso da utilização de banco de dados, já que um controle de contaminação e a detecção de erros de identificação da espécie não podem ser realizados facilmente.

A análise filogenética final corrobora o não monofiletismo de Cynodontidae com Cynodontinae também monofilético e relacionado à Prochilodontidae, Hemiodontidae, Parodontidae e Serrasalminidae, mas sua relação com estes grupos não pôde ser esclarecida. Roestinae aparece em um clado com representantes de Heterocharacinae, com *Acestrorhynchus* na base

e dentro de um ramo composto por espécies formalmente reconhecidas como Characidae. Tal resultado concorda com outras análises moleculares que incluíram representantes de Cynodontinae e/ou Roestinae (Calcagnotto *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011), mas discorda das filogenias morfológicas em relação ao posicionamento de *Acestrorhynchus* (relacionado à Cynodontinae nestas análises). Roestinae foi considerado grupo-irmão de Cynodontinae por Howes (1976), Lucena & Menezes (1998) e Moreira (2007), e grupo-irmão de Heterocharacinae por Menezes (1974), Lucena (1993) e Mattox (2010). A inclusão de *Loncogenys* em Roestinae aqui obtida parece ser resultado do uso limitado de caracteres (o que será ampliado para a publicação) e por isso, acreditamos que Heterocharacinae e Roestinae sejam grupos monofiléticos relacionados, corroborando com os autores acima.

A análise concatenada é utilizada em inferências filogenéticas porque a história evolutiva de um único gene pode não refletir a verdadeira história evolutiva de um determinado grupo devido a diversos fatores entre eles, a taxa de mutação (que pode gerar saturação de bases) e os eventos de *indels*, ambos geradores de homoplasias gênicas após o alinhamento. Entretanto, quando o mesmo agrupamento é encontrado por genes diferentes, isso é um indício de que a verdadeira história evolutiva está sendo recuperada. Entre as seis regiões gênicas utilizadas neste trabalho (incluindo o íntron S7), a maioria detectou a proximidade entre espécies de Roestinae e de Heterocharacinae, entre *Triportheus* e *Agoniates*, entre *Brycon* e *Salminus*, entre gêneros de Characinae (com os grupos-irmão *Cynopotamus* + *Galeocharax* e *Charax* + *Roeboides*), entre Characinae e *Exodon*, e entre gêneros de Alestidae (exceto *Arnoldichthys*). Todas estas relações já haviam sido propostas na literatura e são fortalecidas neste trabalho.

Por outro lado, o grupo próximo à base da filogenia é diferente a cada região gênica analisada. Além disso, Erythrinidae varia bastante o seu posicionamento, assim como *Arnoldichthys* que só é encontrado no mesmo grupo (Alestidae) com o *myh6* e com a *rag2*. Dessa forma, o posicionamento destes grupos sob o enfoque molecular deve ser analisado cuidadosamente e com a inclusão de outras regiões gênicas para fortalecer o conhecimento sobre as relações de parentesco, especialmente em grupos mais basais, como parece ser o caso de Crenuchidae, Erythrinidae, Hepsetidae, Ctenoluciidae,

Lebiasinidae e Alestidae (Lucena, 1993; Calcagnotto *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011). Outras relações que aparecem discrepantes entre as filogenias gênicas e também em relação à literatura (especialmente com o *myh6* em Characidae e com o *S7*) devem ser reflexos da história evolutiva da região gênica analisada mais do que da história dos grupos envolvidos.

A definição das relações entre as espécies de cada subfamília foi inferida pela análise concatenada das regiões 16S, ATPase e *S7*, que obteve os clados *H. armatus* + *H. tatauaia* e *H. wallacei* + *H. scomberoides* compondo o clado *Hydrolycus*, e com *R. molossus* na posição basal do clado de *Roestes*. Esse resultado difere das filogenias morfológicas, já que Lucena & Menezes (1998) não conseguiram resolver o clado *Roestes* e *Hydrolycus* foi recuperado por Toledo-Piza (2000) com *H. wallacei* na posição basal. É interessante notar que enquanto as relações de *Hydrolycus* são constantes em todas as regiões analisadas, as relações de *Roestes* se alteram com a ATPase, com *R. ogilviei* na posição basal.

É interessante notar que enquanto *H. wallacei* e *H. scomberoides* são espécies restritas às áreas baixas, *H. armatus* e *H. tatauaia* ocorrem prioritariamente nas regiões dos escudos da Guiana e Brasileiro. Além disso, as distribuições de *H. wallacei* e *H. scomberoides* praticamente não se sobrepõem, com *H. wallacei* ocorrendo em rios de água preta e *H. scomberoides* em rios de água branca (figura 6.1), o que (junto com a filogenia obtida) pode refletir um evento de especiação ocasionado após o estabelecimento de uma barreira química.

Lima & Ribeiro (2011) argumentam que, apesar da incerteza sobre a extensão das transgressões marinhas, o último desses eventos deve representar o ponto de partida para as análises biogeográficas de espécies restritas às terras baixas. Segundo Ramos & Aleman (2000), a última transgressão marinha ocorreu na Amazônia no Mioceno médio (12 milhões de anos atrás), o que indica uma origem muito antiga do grupo Cynodontinae. Além disso, a distribuição de *Rhaphiodon vulpinus* tanto na Bacia Amazônica quanto na Bacia do Paraná fornece mais um indício da idade do grupo, já que essas bacias estão separadas há milhões de anos. Esta ampla distribuição de *Rhaphiodon vulpinus* foi o que nos motivou a realizar uma análise populacional com essa espécie.

Para tanto, a idéia inicial abrangia somente a análise com locos de microssatélites que seriam desenvolvidos ao longo do projeto, o que começou a ser realizado no início de 2010 na disciplina “NT 264A – microssatélites para estudos genéticos de eucariotos: um curso teórico e prático” oferecida pelo programa de pós-graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) sob a coordenação dos professores Michel Vincentz, Anete Pereira de Souza e Maria Imaculada Zucchi. Entretanto, a clonagem não funcionou durante o curso e precisou ser refeita, o que contou com as colaborações da Profa. Anete de Souza e seu aluno Danilo Augusto Sforça para a clonagem por eletroporação, e da Profa. Dra. Maria Cristina Arias e sua aluna Elaine A. Franço do Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), onde foi realizada a segunda etapa da clonagem no início de 2011.

Devido ao atraso na construção da biblioteca, resolvemos incluir a análise por sequenciamento, o que requereu testes de polimorfismos de diferentes regiões gênicas (S7, D-loop, ATPase, cytb, ND2 e ND4). Após vários testes, obtivemos bons valores de divergência com o primeiro íntron do S7 (1,5% de divergência entre amostras do Rio Solimões e do Rio Paraná). Entretanto, por se tratar de outro marcador nuclear, resolvemos investir no desenvolvimento de um marcador mitocondrial. A região D-loop de *Rhaphiodon vulpinus* não apresentou um bom padrão de amplificação e por isso não chegou a ser seqüenciada. As sequências obtidas mostraram baixa divergência para a maioria das regiões analisadas (citocromo b e as subunidades 2 e 4 da NAD desidrogenase), entretanto, observamos mais de 1% de divergência com a ATPase, que por isso foi a região escolhida para o estudo da diversidade genética de *R. vulpinus*.

Os resultados obtidos pelo sequenciamento mostraram a existência de três grupos genéticos distintos, que correspondem à Bacia do Paraná, ao oeste da Amazônia e ao leste da Amazônia (rios Araguaia e Xingu), além disso, um contato entre o Rio Madeira e a Bacia do Paraná foi evidenciado. Desta forma, *R. vulpinus* parece possuir uma história demográfica antiga, já que os dados moleculares indicam conexões históricas que permitiram a dispersão entre drenagens (Hubert & Renno, 2006). Os grupos genéticos podem estar

relacionados às áreas de refúgio aquático propostas por Hubert & Renno (2006), e por isso devem ser considerados Unidades Evolutivas Significativas (UES) separadas.

O padrão de diversidade dentro de cada uma das três UES mostra valores moderados na Bacia Amazônica (com o oeste mais diverso o leste) e valores muito baixos na Bacia do Paraná, e com uma baixa divergência intragrupos, apesar de as distâncias geográficas alcançarem mais de 3.400 km, o que indica uma grande capacidade migratória de *R. vulpinus* na ausência de barreiras. Além disso, na UES do oeste da Amazônia foi detectada uma expansão populacional.

Hubert & Renno (2006) relatam uma diferenciação preferencialmente leste-oeste na região amazônica, o que pode estar relacionado à origem recente do sistema de drenagem do oeste da Amazônia, o que pode explicar também a expansão populacional observada em *R. vulpinus* desta região. Além desta expansão, *Rhaphiodon vulpinus* pode ter passado por uma expansão de habitat, pois um padrão de isolamento pela distância foi evidenciado.

Desta forma, os resultados indicam que *R. vulpinus* apresenta grande capacidade migratória, com isolamento pela distância, e por isso deve constar nas listas de espécies migradoras.

A subdivisão populacional encontrada parece ser decorrente de eventos históricos, o que necessita ser investigado. Para tanto, optamos pela análise de locos polimórficos de microssatélites em *R. vulpinus*. O marcador foi desenvolvido no presente estudo e 11 locos foram isolados e caracterizados para a espécie. Os resultados de amplificação heteróloga evidenciaram a utilidade do marcador para estudos populacionais nas espécies de Cynodontinae, com a amplificação de seis locos em cada um dos outros gêneros de Cynodontinae (*Cynodon* e *Hydrolycus*).

Na análise populacional de *Rhaphiodon vulpinus* foram recuperados os mesmos grupos encontrados na análise com a ATPase, com a diferença que a amostra do alto Xingu se mostrou bastante diferenciada das outras do grupo do leste da Amazônia, subdividindo essa região em duas unidades evolutivas.

Em relação à diversidade, os grupos genéticos apresentaram um padrão de similar ao obtido pelo sequenciamento da ATPase, com os menores valores na Bacia do Paraná e os maiores no oeste da Amazônia. O grupo Paraná

possui diversidade reduzida provavelmente devido ao efeito fundador aliado às alterações ambientais ocorridas na região. Detectamos ainda um gargalo populacional no leste da Amazônia, e a redução de diversidade no alto Xingu.

Devido ao alto Xingu ter apresentado indícios de estruturação também com a análise da ATPase, refizemos o teste de variância molecular utilizando dados do sequenciamento da ATPase com os quatro grupos evidenciados pelos microssatélites. Os novos resultados apresentaram significância para os três níveis hierárquicos, com a diferença de que houve uma diminuição da variação entre as amostras do mesmo grupo (tabela 6.1).

É interessante notar que nos microssatélites a maior diversidade está entre as localidades, o que demonstra a grande variabilidade obtida pela análise com esse marcador; enquanto que no DNA mitocondrial a maior diversidade está entre os grupos, provavelmente por ter uma taxa evolutiva menor do que a dos microssatélites. Entretanto, quando olhamos os dados obtidos pelo sequenciamento da ATPase sob a perspectiva da estruturação encontrada pelos microssatélites, obtemos indícios que corroboram a esta estruturação. Por isso e pelas taxas de evolução dos marcadores, as três UES encontradas pela ATPase são mais antigas do que a divisão da UES do leste da Amazônia, que parece ser proporcionada pelo isolamento de *R. vulpinus* pelas cachoeiras do Xingu.

Os microssatélites permitiram ainda a identificação da proporção de contribuição dos grupos genéticos em cada indivíduo, o que corroborou os dados do sequenciamento da ATPase que indicavam o contato secundário entre a Bacia do Paraná e o Rio Madeira. A UES da Bacia do Paraná aparece contribuindo apenas no *pool* gênico do Rio Madeira através de um fluxo unidirecional devido provavelmente à captura de riachos para a Bacia Amazônica. Entretanto, como evidenciado na tabela 6.2, a Cachoeira do Teotônio é uma barreira nas análises com microssatélites, mas não é nas análises do mtDNA.

A análise de agrupamentos apresentou ainda uma alta contribuição do grupo do alto Xingu na amostra do Rio Araguaia (GO); além disso, três locos (Rv3, Rv4 e Rv13) indicam contato entre estas localidades, o que pode estar relacionado a um evento de troca de faunas devido à captura de riachos do alto Xingu para o Araguaia. É interessante notar que tanto RO quanto GO

apresentam valores discrepantes de diversidade nucleotídica e Tau em relação às outras amostras do grupo, o que pode ser um indício de mistura de faunas nestas localidades.

Desta forma, a história demográfica de *Rhaphiodon vulpinus* parece estar intimamente relacionada a eventos geológicos, já que a estruturação encontrada nesta espécie parece refletir o conhecimento atual sobre a formação das bacias hidrográficas. Além disso, *R. vulpinus* parece ser uma espécie bastante antiga, especialmente pela estruturação encontrada dentro da Bacia Amazônica, e por isso, tanto a diminuição do tamanho populacional devido a eventos vicariantes, quanto a expansão populacional devido à expansão de habitats podem ter acontecido nesta espécie.

O conjunto de dados obtidos nesta tese descreve um panorama geral que contribuirá para o esclarecimento das relações filogenéticas em Characiformes e também entre as espécies de *Roestes* e *Hydrolycus* e entre os gêneros de Cynodontinae. Além disso, preenche uma lacuna sobre o conhecimento acerca da variabilidade genética de *Rhaphiodon vulpinus*, contribuindo para a compreensão de aspectos da história evolutiva e da dinâmica de populações desta espécie Neotropical, que parece ser mais antiga do que a formação dos sistemas de drenagem atuais.

Figura 6.1: Distribuições das espécies de *Hydrolycus*.

Tabela 6.1: AMOVA obtida para a região da ATPase 6/8 de *Rhaphiodon vulpinus* com os quatro grupos evidenciados pela análise dos microssatélites.

	Varição	g.l.	Componentes da variância	Porcentagem do total	P *	ϕ
4 grupos: Paraná; Alto Xingu; Araguaia + baixo Xingu; e oeste da Amazônia	Entre grupos	3	2,16409 Va	75,50	0	0,75498
	Entre amostras do mesmo grupo	6	0,11133 Vb	3,88	0,01173	0,15852
	Entre amostras	91	0,59100 Vc	20,62	0	0,79382

Tabela 6.2: Em destaque apresentamos a localização no Rio Madeira da contribuição genética do grupo Paraná.

localidade	Posição em relação à Cachoeira do Teotônio	ID	N _{micro}	N _{seq}
Igarapé Sotério	Montante	71 a 73	3	2*
Igarapé Mutumparaná	Montante	69 e 70	2	
Igarapé São Lourenço	Montante	65 a 68	4	
Igarapé Jatuarana	Jusante	89 a 94	6	6
Igarapé Belmont	Jusante	95	1	1*
Lago Cuniã	Jusante	98 e 99	2	
Lago Puruzinho	Jusante	100	1	
Manicoré	Jusante	74 a 79	6	1
Aripuanã	Jusante	80 a 88	9	
Lago Sampaio	Jusante	96 e 97	2	2*

* Haplótipo A encontrado nos indivíduos 72, 95 e 97 e haplótipo B no indivíduo

Resumo

Cynodontidae (*sensu* Lucena & Menezes, 1998) é uma família de Characiformes com 14 espécies válidas divididas em duas subfamílias (Cynodontinae e Roestinae). As espécies de Cynodontinae sempre foram classificadas em um mesmo grupo, enquanto que Roestinae já foi classificada junto com Characidae. Com o objetivo de testar o monofiletismo de Cynodontidae, realizamos uma análise de máxima parcimônia com o algoritmo TBR em 42 táxons representando 12 famílias de Characiformes. A análise foi realizada com três regiões nucleares e três genes mitocondriais; entretanto, o íntron da RPS7 foi retirado da análise final por questões de homologia do alinhamento. A árvore consenso obtida com 9842 passos (IC = 0,351 e IR = 0,358) evidencia o não monofiletismo de Cynodontidae, com Cynodontinae relacionada a um clado composto por Serrasalminidae, Prochilodontidae, Hemiodontidae e Parodontidae, enquanto que Roestinae aparece dentro de Characidae relacionada à Heterocharacinae. Acestrorhynchidae foi recuperada na base do clado Roestinae/Heterocharacinae, o que condiz com outras filogenias moleculares e difere das filogenias morfológicas. As relações entre as espécies de *Roestes* e de *Hydrolycus* também foram recuperadas. As outras relações encontradas condizem com dados recentes da literatura, fortalecendo o conhecimento sobre a ictiofauna de água doce.

A espécie *Rhaphiodon vulpinus* se destaca entre os Cynodontíneos por apresentar uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em sistemas atualmente separados como as bacias do Paraná e do Amazonas. Por isso, uma análise da variabilidade e da estrutura populacional desta espécie foi realizada com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a influência do passado geológico na distribuição da ictiofauna Neotropical, além de fornecer áreas prioritárias de conservação. Inicialmente, o estudo foi realizado com sequências do gene da ATPase do mtDNA, e os resultados evidenciaram a existência de três grupos genéticos que foram considerados UES distintas (Bacia do Paraná, oeste da Amazônia e leste da Amazônia). Entretanto, a hipótese de contato secundário com mistura de fauna entre a Bacia do Paraná e o Rio Madeira foi postulada para explicar os resultados.

Para testar tal hipótese, foi desenvolvida a biblioteca de microssatélites de *R. vulpinus*, já que este marcador é mais sensível para a detecção de estruturas populacionais. Foram obtidos 11 locos polimórficos, sendo que sete funcionaram em outros gêneros de Cynodontinae. A análise com microssatélites confirmou a conexão entre o oeste da Amazônia e a Bacia do Paraná, provavelmente devido à captura de riachos para a sub bacia do Rio Madeira. Uma grande diferença entre as análises é a subdivisão UES do leste da Amazônia (rios Araguaia e Xingu) devido à grande diferenciação do alto Xingu. Além disso, esta localidade parece ter contribuído no *pool* gênico do Araguaia após a estruturação, o que pode indicar outro evento de captura de cabeceiras. Estes eventos, no entanto, seriam relativamente recentes na história evolutiva de *R. vulpinus*, assim como é a barreira estabelecida pela Cachoeira do Teotônio no Rio Madeira, já que a mesma não foi detectada como barreira na análise do mtDNA.

A história demográfica de *Rhaphiodon vulpinus* parece estar intimamente relacionada a eventos geológicos, já que a estruturação encontrada reflete o conhecimento atual sobre a formação das bacias hidrográficas. Além disso, *R. vulpinus* parece ser uma espécie bastante antiga, especialmente pela estruturação encontrada dentro da Bacia Amazônica. Por isso, tanto a diminuição do tamanho populacional (detectada no leste da Amazônia pelos microssatélites) quanto a expansão populacional (detectada no oeste da Amazônia pela ATPase) podem ter acontecido nesta espécie.

R. vulpinus parece ser uma espécie com grande capacidade migratória, já que apresenta isolamento pela distância e estruturação relacionada à barreiras históricas. Em relação aos padrões de diversidade, ambos os marcadores evidenciaram uma diversidade moderadamente alta na Amazônia (com os maiores valores no oeste) e uma baixa diversidade na Bacia do Paraná, provavelmente devido à colonização da bacia aliado às alterações ambientais ocorridas na região. O conjunto de dados obtidos contribuirá para o esclarecimento das relações filogenéticas em Characiformes e também para a compreensão de aspectos da história evolutiva e da dinâmica de populações de *R. vulpinus*, uma espécie que parece ser mais antiga do que a formação atual dos sistemas de drenagem.

Abstract

Cynodontidae (*sensu* Lucena & Menezes, 1998) is a Characiform family with 14 valid species which are divided in two subfamilies (Cynodontinae and Roestinae). Cynodontinae species were always classified in the same group meanwhile Roestinae has already been classified together with Characidae. In order to test the monophylestism of Cynodontidae, we have conducted a Maximum Parsimony Analysis using the algorithm TBR in 42 taxa, which represent 12 Characiform families. The analysis was performed with three nuclear regions and three mitochondrial genes; the first intron of RPS7 was removed from the final analysis due to problems related to alignment homology. The consensus tree obtained with 9842 steps (IC = 0,351 and IR = 0,358) does not support the monophylestism of Cynodontidae, which appears in a clade composed by Serrasalminidae, Prochilodontidae, Hemiodontidae, and Parodontidae; Roestinae appears within Characidae, close-related to Heterocharacinae. Acestrorhynchidae was recovered at the base of Roestinae/Heterocharacinae clade, which is in agreement with other molecular phylogenies and in disagreement with the morphological ones. The relationship between *Roestes* and *Hydrolycus* species was also recovered. Other relationships obtained are in agreement with recent data described elsewhere, which reinforces the knowledge on the freshwater fish fauna.

The species *Rhaphiodon vulpinus* stands out from other Cynodontinae species due to its wide geographic distribution, occurring in basins that are currently separated as is the case of Paraná and Amazon. Within this context, population variability and structure analyses were conducted with the aim of expanding the knowledge related to the influence of geological history on the distribution of Neotropical fish fauna as well as to provide priority areas for conservation means. Initially, the study was carried out with ATPase gene sequences from mtDNA and the results evidenced the existence of three genetic groups which were considered as different ESUs (Evolutionary Significant Units; Paraná, Western Amazon, and Eastern Amazon). However, a secondary contact hypothesis with fauna mixture between Paraná and Madeira river basins was formulated in order to explain the results.

In order to test such hypothesis, a microsatellite library was developed for *R. vulpinus*, once this marker is more sensitive for the detection of population structure. 11 polymorphic *loci* were obtained and among them, seven showed to be useful in other Cynodontinae genus. The microsatellite analysis confirmed the connection between the Western Amazon and the Paraná basin, which probably occurred as a result of headwaters capture by the Madeira river sub-basin. The major difference between the analyses comprises the ESU sub-division in Eastern Amazon (Araguaia and Xingu rivers) due to the high differentiation of Upper Xingu. Moreover, this locality may have contributed on the Araguaia gene pool after its structuration process, which may be an indicative of another headwaters capture event. However, those events would be relatively recent in the *R. vulpinus* evolutive history, likewise the barrier formed by Teotônio Falls in Madeira river, once it was not detected as a barrier by mtDNA analysis.

The demographic history of *R. vulpinus* seems to be tightly related to geologic events, once the structure obtained reflects the current knowledge on the formation of hydrographic basins. Furthermore, *R. vulpinus* seems to be a very old species, mainly due to the structure found within the Amazon basin. Thus, both the reduction of population size (detected in Eastern Amazon by microsatellite) and the population expansion (detected in Western Amazon by ATPase) may have occurred in this species.

R. vulpinus seems to be a species with a high migration capacity, once it presents isolation by the distance and structuration related to historical barriers. Regarding the diversity patterns, both markers evidenced a slightly high diversity in the Amazon (high values on Western) and low diversity in the Paraná basin, possibly due to the occupation of the basin modulated by environmental changes that occurred in the region. Those data will contribute to resolve the phylogenetic relationships in Characiform and for the understanding of some aspects of the evolutive history and population dynamics of *R. vulpinus*, a species that seems to be older than the current drainage systems.

Referências bibliográficas completas

- Abell, Robin, Michele L. Thieme, Carmen Revenga, Mark Bryer, Maurice Kottelat, Nina Bogutskaya, Brian Coad, *et al.* 2008. Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. *BioScience* 58 (5): 403. doi:10.1641/B580507.
- Aboim, M.A.; Menezes, G.M.; Schlitt, T. & Rogers, A.D. 2005. Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. *Molecular Ecology* 14:1343-1354.
- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Suzuki, H.I. & Júlio-Jr, H.F. 2003. *Migratory Fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil*. In: *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status* (Ed. Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C. & Baer, A.). IDRC e World Bank, Canadá. p 19-98.
- Agostinho, A.A.; Thomaz, S.M. & Gomes, I.C.. 2005. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conservation Biology* 19 (3):646-652.
- Albert, J.S.; Petry, P. & Reis, R.E. 2011. *Major biogeographic and phylogenetic patterns*. In: *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. (Ed. Albert, JS & Reis RE). University of California Press. p 21-58.
- Albert, J.S. & Reis, R.E. 2011. *Introduction to Neotropical Freshwaters*. In: *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (Ed. Albert, JS & Reis RE). University of California Press. p 3-20.
- Allendorf, F. W. & Luikart, G. 2006. *Conservation and the Genetics of Populations*. Wiley-Blackwell, 664 p.
- Almeida, V. L. L., N. S. Hahn, and Aeam Vazzoler. 1997. Feeding patterns in five predatory fishes of the high Parana River floodplain (PR, Brazil). *Ecology of Freshwater Fish* 6 (3):123-133.
- Aljanabi, S.M. & Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692–4693.
- Alves-Gomes, J.A., G. Ortí, M. Haygood, W. Heiligenberg, & A. Meyer. 1995. Phylogenetic analysis of the south american electric fishes (order gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology Evolution* 12 (2):298-318.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*: Chapman & Hall.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb, and N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge between Population Genetics and Systematics. *Annual Review Ecology Systematics* 18:489-522.
- Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13:729-744.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Baroni, S. 2011. Estudos moleculares em *Gymnotus pantherinus* (Gymnotiformes, Gymnotidae): uma abordagem sistemática e

- filogeográfica. *Tese de Doutorado*. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- Beheregaray, L. B., C. Ciofi, A. Caccone, J. P. Gibbs, & J. R. Powell. 2003. Genetic divergence, phylogeography and conservation units of giant tortoises from Santa Cruz and Pinzón, Galápagos Islands. *Conservation Genetics* 4 (1):31-46.
- Beheregaray, L. B., and P. Sunnucks. 2000. Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* species group and their use in other South American silverside fish. *Molecular Ecology* 9 (5):629-631.
- Bermingham, E., and A. P. Martin. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology* 7 (4):499-517.
- Billotte N, Lagoda P.J.L, Risterucci A & Baurens FC 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277–288.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10 (3):295-304.
- Britski, H.A. 1995. *As bacias hidrográficas e a preservação da biodiversidade*. In: Seminário sobre a fauna aquática e setor elétrico brasileiro: gerenciamento de bacias hidrográficas e a fauna aquática. Comitê Coordenador das Atividades de Meio Ambiente do Setor Elétrico – COMASE, ELETROBRÁS. Rio de Janeiro.
- Brower, A. V. Z. 1999. Delimitation of phylogenetic species with DNA sequences: a critique of Davis and Nixon's population aggregation analysis. *Systematic Biology* 48: 199-231.
- Buckup, P.A. 1998. *Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei, Ostariophysi)*. In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Edipucrs. Pp.123-144.
- Calcagno, D., M. Russello, and R. DeSalle. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Notes* 1 (4):245-247.
- Calcagno, D., S. A. Schaefer, and R. DeSalle. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36 (1):135-153.
- Camargo, M; Giarrizzo, T. & Isaac, V. 2004. Review of the geographic distribution of fish fauna of the Xingu river basin, Brazil. *Ecotropica* 10: 123–147.
- Carvalho, T.P. & Albert, J.S. 2011. *The Amazon-Paraguay divide*. In: Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes (Ed. Albert, JS & Reis RE). University of California Press. p 193-203.
- Chow, S. & Hazama, K. 1998. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology* 7: 1247–1263.
- Cooke, G.M.; Chao, N.L. & Beheregaray, L.B. 2009. Phylogeography of a flooded forest specialist fish from central Amazonia based on intron DNA: the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*. *Freshwater Biology* 54(6): 1365-2427.
- Dionne, M., F. Caron, J.J. Dodson, And L. Bernatchez. 2008. Landscape genetics and hierarchical genetic structure in Atlantic salmon: the

- interaction of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology* 17:2382-2396.
- Doyle, J. J. 1992. Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Syst. Bot* 17 (1):144-163.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson, A. 2011. Geneious v5.4, Available from <http://www.geneious.com/>
- Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Edgar, Robert C. (2004), MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-1797.
- El Mousadik A, Petit RJ. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Agania spinosa* (L.) Skeels] endemic of Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92, 832-839.
- Escalona, T.; Engstrom, T.N.; Hernandez, O.E.; Bock, B.C.; Vogt, R.C. & Valenzuela, N. 2009. Population genetics of the endangered South American freshwater turtle, *Podocnemis unifilis*, inferred from microsatellite DNA data. *Conservation Genetics* 10 (6): 1683-1696.
- Estoup, A., I. J. Wilson, C. Sullivan, J. M. Cornuet, and C. Moritz. 2001. Inferring Population History From Microsatellite and Enzyme Data in Serially Introduced Cane Toads, *Bufo marinus*. *Genetics* 159 (4):1671-1687.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131 (2):479-491.
- Farias, I. P., G. Ortí, and A. Meyer. 2000. Total Evidence: Molecules, Morphology, and the Phylogenetics of Cichlid Fishes. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* 288:76-92.
- Farris, J. S. 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5 (4):417-419.
- Felsenstein J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.6. Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington, Seattle.
- Fernandes-Matioli, F. M. 1999. Evolução e estrutura de populações no gênero *Gymnotus*(Pisces: Gymnotiformes). *Tese de Doutorado*. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Filleul, A. & Maisey, J.G. 2004. Redescription of *Santanichthys diasii* (Otophysi, Characiformes) from the Albion of the Santana Formation and Comments on Its Implications for Otophysan Relationships. *American Museum Novitates* 3455.

- FitzSimmons, N. N., C. Moritz, C. J. Limpus, L. Pope, and R. Prince. 1997. Geographic Structure of Mitochondrial and Nuclear Gene Polymorphisms in Australian Green Turtle Populations and Male-Biased Gene Flow. *Genetics* 147 (4):1843-1854.
- Frankham, R., J.D. Ballou, and D.A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Frickhinger, K.A. 1995. *Fossil Atlas, Fishes*. Jefferies, R.P.S. (trad). Tetra Press.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics* 147 (2):915-925.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.*, 12:543-548.
- Garcez, R. 2006. Análise da estrutura genética populacional do curimatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do Rio Grande, SP. *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 100 p.
- GARCEZ, R.; CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO-PIZA, M.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2009. Relações filogenéticas na família Cynodontidae (Teleostei, Characiforme), com base em três regiões gênicas. In: Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes 2009. Ponta Grossa. CD-ROM de resumos,
- GARCEZ, R.; CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO-PIZA, M. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2010. Phylogenetic relationships of the Cynodontidae (Teleostei, Characiformes) based on mitochondrial and nuclear gene sequences. In: Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists 2010. Providence. CD Rom de resumos.
- GARCEZ, R.; CALCAGNOTTO, D. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2011. Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus*(Characiformes) from rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 21 (3): 268-275.
- Géry, J. 1966. *Hoplocharax goethei*, a new genus and species of South American characoid fishes, with a review of the sub-tribe Heterocharacini. *Ichthyologica* 38: 281-296.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3).
- Goloboff, P., S. Farris, and K. Nixon. 2003. TNT - Tree analysis using New Technology (BETA) ver. 1.1 Programa e documentação disponível em: www.zmuc.dk/public/phylogeny.
- Grant, W. S., & Bowen, B. W. 1998. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights from Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. *Journal of Heredity*, 89(5), 415-426.
- Graves, J.E. 1998. Molecular insight into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity* 89 (5): 427-437.
- Hancock, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *Microsatellites: Evolution and Applications*:1-9.

- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum Biol* 66 (4):591-600.
- Hausdorf, B.; Wilkens, H & Strecker, U. 2011. Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60 (1): 89-97. Doi: 10.1016/j.ympev.2011.03.009.
- Howes, G.J. 1976. The cranial musculature and taxonomy of characoid fishes of the tribe Cynodontini and Characini. *Bull. of British Museum of Natural History (zoology)* 23: 203-248.
- Hubert, N., and J.-F. Renno. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography* 33:1414-1436.
- Iervolino, F.; Resende, E.K. & Hilsdorf, A.W.S. 2010. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) population in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. *Fisheries Research* 101: 27–31
- Iguchi, K., K. Watanabe, and M. Nishida. 1999. Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations. *Aquaculture* 178 (3):235-243.
- Ikeda, Minoru, and Nobuhiko Taniguchi. 2002. Genetic variation and divergence in populations of ayu *Plecoglossus altivelis*, including endangered subspecies, inferred from PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. *Fisheries Science* 68 (1):18-26.
- Javonillo, R.; Malabarba, L.R.; Weitzman, S.H. & Burns, J.R. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 498-511.
- Kijas, JM, J. C. Fowler, C. A. Garbett, and M. R. Thomas. 1994. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques* 16 (4):656-60.
- Kocher, T. D.; Thomas, W.K.; Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6196–6200.
- Lavoue, S., and J. P. Sullivan. 2004. Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution, Cambridge* 33 (1):171-185.
- Li, M., F. Wei, B. Goossens, Z. Feng, H. B. Tamate, M. W. Bruford, and S. M. Funk. 2005. Mitochondrial phylogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fulgens*): implications for conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36 (1):78-89.
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, and E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11 (12):2453-2465.
- Lima, F.C.T. & Ribeiro, A.C., 2011. *Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology*. In: Historical Biogeography of Neotropical

- Freshwater Fishes (Ed. Albert, JS & Reis RE). University of California Press. p 145-164.
- Lowe-McConnell, R. H. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo: Edusp.
- Lu, C.-P., C.A. Chen, C.-F. Hui, T.-D. Tzeng, and S.-Y. Yeh. 2006. Population Genetic Structure of the Swordfish, *Xiphias gladius* (Linnaeus, 1758), in the Indian Ocean and West Pacific Inferred from the Complete DNA Sequence of the Mitochondrial Control Region. *Zoological Studies* 45 (2): 269-279.
- Lucena, C.A.S. 1993. Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). *Tese de doutorado*, Universidade de São Paulo.
- Lucena, C.A.S. 1998. Relações filogenéticas e definição do gênero *Roeboides* Gunther (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, série Zoologia* 11: 19-59.
- Lucena, C.A.S. 2000. Revisão taxonômica e filogenia das espécies transandinas do gênero *Roeboides* Gunther (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, série Zoologia* 13: 3-63.
- Lucena, C. A. S., & Menezes, N. A. 1998. A phylogenetic analysis of *Roestes* Gunther and *Gilbertolus* Eigenmann, with a hypothesis on the relationships of the Cynodontidae and Acestrorhynchidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). *In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Edipucrs*: 261-278.
- Lucena, C.A.S. & Menezes, N.A. 2003. Subfamily Characinae. *In: Checklist of the freshwater fishes of South and Central América* (Ed. Reis, R.E.; Kullander, S.O. & Ferraris Jr., C.J.). EDIPUCRS, Porto Alegre. P 200-208.
- Lundberg, J.G. 1997. Fishes of the La Venta fauna: additional taxa, biotic and paleoenvironmental implications. *In: Vertebrate paleontology in the Neotropics. The Miocene fauna of La Venta*: Smithsonian Institution Press.
- Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Gerrero, J., Horton, B., Malabarba, M.C.S.L., and Wesselingh, F. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of Tropical South Americans rivers. *In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Edipucrs*:13-68.
- Marques, D.K.S. 2002. Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros. *Documentos* 36. Embrapa. Corumbá, MS.
- Mattox, G.M.T. 2010. Estudo filogenético de Characinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Tese de doutorado*. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- Mayer, C. 2010 Phobos versão 3.3.11 Programa de busca de repetições. Disponível em: http://www.rub.de/spezzoo/cm/cm_phobos.htm
- Melo, C.E.; Lima, J.D. & Silva, E.F. 2009. Relationships between water transparency and abundance of Cynodontidae species in the Bananal floodplain, Mato Grosso, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 7(2): 251-256,
- Mendes dos Santos, G., M. Jegú, and B. de Merona. 1984. Catálogo de peixes comerciais do baixo rio Tocantins. 83 pages. *Manaus, Brazil: Centrais Elétricas do Norte do Brasil, SA (Electronorte), Choselho Nacional de*

- Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), & Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA).
- Menezes, N. A. 1974. Redescription of the genus *Roestes* (Pisces, Characidae). *Papéis avulsos de zoologia* 27(17):219-225.
- Menezes, N. A. 2003. Family Acestrorhynchidae. In: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. (Ed. Reis RE, Kullander SE, Ferraris-Jr CJ.). Porto Alegre: Edipucrs. p 231-233
- Menezes, N. A., & C. A. S. Lucena. 1998. Revision of the subfamily Roestinae (Ostariophysi: Characiformes: Cynodontidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 9 (3):279-291.
- Miya, Masaki, Hirohiko Takeshima, Hiromitsu Endo, Naoya B Ishiguro, Jun G Inoue, Takahiko Mukai, Takashi P Satoh, *et al.* 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26 (1): 121-138.
- Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* 12:1855-1867.
- Moritz, C., T. E. Dowling, and W. M. Brown. 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Reviews in Ecology and Systematics* 18 (1):269-292.
- Mirande, J. M. 2009. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics*, 25(6): 574-613.
- Mirande, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8(3): 385-568.
- Moreira, C. R. 2007. Relações filogenéticas na ordem Characiformes (Teleostei, Ostariophysi). *Tese de doutorado*. Universidade de São Paulo.
- Moysés, C. B., S. Mockford, L. F. Almeida-Toledo, and J. M. Wright. 2005. Nine polymorphic microsatellite loci in the Neotropical electric eel *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Molecular Ecology Notes* 5 (1):7-9.
- Moysés, C.B. & Almeida-Toledo, L.F. 2002. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish espécies of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 25 (4): 401-407.
- Moysés, C.B. 2005. Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes). *Tese de Doutorado*. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- Natoli, A., V. M. Peddemors, and A. Rus Hoelzel. 2004. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Journal of Evolutionary Biology* 17 (2):363-375.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*: Columbia University Press.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Neigel, J. E. 2002. Is FST obsolete? *Conservation Genetics* 3 (2):167-173.
- Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, Inc.

- Netto-Ferreira, A.L. 2006. Relações filogenéticas dos gêneros de Lebiasinidae (Ostariophysi, Characiformes). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Rio de Janeiro/Museu Nacional, Brasil. 375 pp.
- Network versão 4.5. Disponível em: fluxus-engineering.com. Acessado em 2009.
- Neuberger, A.L., E.E. Marques, C.S. Agostinho, & R.J. de Oliveira. 2007. Reproductive biology of *Rhaphiodon vulpinus* (Ostariophysi: Cynodontidae) in the Tocantins River Basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology* 5 (4):479-484.
- Oliveira, C.; Avelino, G.S.; Abe, K.T.; Mariguela, T.C; Benine, R.C.; Ortí, G.; Vari, R.P. & Corrêa e Castro, R.M. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology* 11 (275). 25 p.
- Orbacz, E. A., and P. M. Gaffney. 2000. Genetic structure of tautog (*Tautoga onitis*) populations assayed by RFLP and DGGE analysis of mitochondrial and nuclear genes. *Fish. Bull* 98 (2):336-344.
- Ortí, G., and A. Meyer. 1997. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 46 (1):75-100.
- Ortí, G., and R. P. Vari. 1996. *Characiformes*. The tree of life: a distributed Internet project containing information about phylogeny and biodiversity. Internet address: URL: <http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html>.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleicacids II: the polymerase chain reaction. In: *Molecular Systematics*. (Eds. Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K.). Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.
- Peakall, R & Smouse, PE. 2006 GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- Pereira, Sergio L., Allan J. Baker, and Anita Wajntal. 2002. Combined Nuclear and Mitochondrial DNA Sequences Resolve Generic Relationships within the Cracidae (Galliformes, Aves). *Systematic Biology* 51 (6):946-958.
- Perez-Lizama, M. A. 1994. Estimativas das taxas de crescimento, recrutamento e mortalidade de espécies de peixes dominantes na planície de inundação do alto rio Paraná (22°40'–22°50'S e 53°15'–53°40'W), Brasil. I. *Rhaphiodon vulpinus* (Agassiz, 1829), (Characiformes, Cynodontidae). *Dissertação de Mestrado* (Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais), Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, Maringá, 24 p.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM. 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90, 502-503.
- Posada, D., and K. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (10):817-818.
- Pretti, V.Q. 2007. Relações Filogenéticas no gênero *Acestrorhynchus* (Teleostei, Characiformes) com base na análise de genes nucleares e mitocondriais. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- Pretti, V.Q.; Calcagnotto, D.; Toledo-Piza, M. & Almeida-Toledo, L.F. 2009. Phylogeny of the Neotropical genus *Acestrorhynchus* (Ostariophysi:

- Characiformes) based on nuclear and mitochondrial gene sequences and morphology: A total evidence approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 312–320.
- Primack, R.; Rozzi, R; Massardo, F. & Feinsinger, P. 2001. Destrucción y degradación del hábitat. *In: Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas*. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Ramos,V.A. & Aleman, A. 2000. Tectonic of the Andes. *In: Tectonic and evolution of South America, 31st International Geological Congress* (Ed. Cordani, U.G.; Milani, E.J.; Thomaz-Filho, A.; Campos, D.A.). Rio de Janeiro. Academia Brasileira de Ciências, e Departamento Nacional de Produção Mineral. P 635-685.
- Ramos-Onsins, S.E. & Rozas, J. 2002. Statistical Properties of new Neutrality Tests against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution* 19, 2092-2100.
- Raymond M. and F. Rousset. 1995a An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995b. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86 (3):248-249.
- Reis, R. E., S. O. Kullander, and C. J. Ferraris. 2003. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*: EDIPUCRS.
- Rice WR. 1989. Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution* 43, 223-225.
- Rieseberg, L.H. 2000. Book Reviews: Phylogeography. The History and Formation of Species. *Tree* 15 (9):384-385.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *In: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. (Ed. Krawetz, S. & Misener, S.) Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Rozzi, R; Primack, R.; Feinsinger, P.; Dirzo, R. & Massardo, F. 2001. Qué es la biología de la conservación? *In: Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas*. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbour-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees'. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Sites-Jr, J. W., & Marshall, J. C. (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Evolution* 18(9): 462-470. doi: 10.1016/S0169-5347(03)00184-8.
- Sivasundar, A., E. Bermingham, and G. Orti. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10 (2):407-417.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47 (1):264-279.

- Slatkin, M. 1995. A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics* 139 (1):457-462.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry*, 3rd (Ed. WH, Freeman) San Francisco, California, USA.
- Strecker, U.; Hausdorf, B. & Wilkens, H. 2012. Parallel speciation in *Astyanax* cave fish (Teleostei) in Northern Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62 (1): 62-70.
- Suzuki, H. I. 1992. Variações na morfologia ovariana e no desenvolvimento do folículo de espécies de peixes teleósteos da bacia do rio Paraná, no trecho entre a foz do rio Paranapanema e a do rio Iguaçu. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0 b10 for 32-Bit Microsoft Windows. Smithsonian Institution. Sinauer Associates.
- Tajima, F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123 (3):585-595.
- Templeton, A. R., E. Routman, and C. A. Phillips. 1995. Separating Population Structure from Population History: A Cladistic Analysis of the Geographical Distribution of Mitochondrial DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140 (2):767-782.
- Toledo-Filho, S.A; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Galhardo, E. & Donola, E. 1992. Conservação Genética de Peixes em Projetos de Repovoamento de Reservatórios. *Cadernos de Ictiogenética* 1. CCS/USP, São Paulo, SP.
- Toledo-Piza, M. 2000. The neotropical fish subfamily Cynodontinae (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes): a phylogenetic study and revision of Cynodon and Rhabiodon. . *American Museum Novitates* 3286.
- Toledo-Piza, M., N. A. Menezes, and G. M. Dos Santos. 1999. Revision Of The Neotropical Fish Genus *Hydrolycus* (Ostariophysi: Cynodontidae) With The Description Of Two New Species. *Ichthyol. Explor. Freshwater* 10 (3):225-280.
- Torrente-Vilara, G.; Zuanon, J.; Leprieur, F.; Oberdorff, T. & Tedeco, P.A. 2011. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). *Ecology of Freshwater Fish* 20 (4): 588-597.
- Triantafyllidis, A., T.J. Abatzopoulos, and P.S. Economidis. 1999. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, Siluridae) populations, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Heredity* 82:503-509.
- Uj, A. 1990. Etude comparative de l'osteologie cranienne des poisson de la famille des Characidae et son importance phylogenetique. Tese de doutorado. Université de Geneve. 191 p.
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D. P. M.; Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 535–538
- Vogler, A. P. & Desalle, R. 1994. Diagnosing units of Conservation Management. *Conservation Biology*, 8(2), 534-563.
- Waldbieser, G. C., and W. R. Wolters. 1999. Application of Polymorphic Microsatellite Loci in a Channel Catfish *Ictalurus punctatus* Breeding Program. *Journal of the World Aquaculture Society* 30 (2):256-262.

- Weber, J. L., and C. Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2 (8):1123-1128.
- Wong, B. B. M., J. S. Keogh, and M. D. Jennions. 2004. Mate recognition in a freshwater fish: geographical distance, genetic differentiation, and variation in female preference for local over foreign males. *Journal of Evolutionary Biology* 17 (3):701-708.
- Wright, J. M., and P. Bentzen. 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4 (3):384-388.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations Ann. *Eugen* 15:323.
- Wright, S. 1943. Isolation by Distance. *Genetics* 28, 114-138.
- Wright, S. 1965. The Interpretation of Population Structure by F-statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution* 19, 395-420.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Zardoya, R., D. M. Vollmer, C. Craddock, J. T. Streelman, S. Karl, and A. Meyer. 1996. Evolutionary Conservation of Microsatellite Flanking Regions and their Use in Resolving the Phylogeny of Cichlid Fishes (Pisces: Perciformes). *Proceedings: Biological Sciences* 263 (1376):1589-1598.