# Pedro Hollanda Carvalho

# Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Biologia-Genética

> Orientador: Prof. Dr. Mário César Cardoso de Pinna

São Paulo 2011 Ficha Catalográfica

# Hollanda Carvalho, Pedro

Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae). 113 pp.

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

 Sistemática molecular
 Filogeografia
 ATP sintase
 Hypostomus ancistroides I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador: Prof. Dr. Mário César Cardoso de Pinna

"Essentially, all models are wrong, but some are useful"

George Edward Pelham Box

Esse trabalho é dedicado aos meus pais (pai e mães) e aos meus avós, que me deram todo o suporte e incentivo para essa conquista.

# Agradecimentos

Ao Mário de Pinna, meu orientador, por me dar a oportunidade de trabalhar em uma das mais importantes e tradicionais instituições zoológicas que existem, e pelo aprendizado em ictiologia e outros assuntos ligados a evolução.

A professora Lurdes Foresti, por viabilizar o início do meu doutorado, e pelo suporte laboratorial em momentos importantes do meu trabalho.

A professora Regina Célia Mingroni Netto, coordenadora do programa de pós-graduação em Biologia-Genética, pela compreensão e conselhos durante a fase final de meu doutorado.

Ao professor Claudio Oliveira, que esteve sempre pronto para ajudar em meu trabalho. Além disso, o professor Cláudio foi o maior colaborador em doação de amostras de tecido, o que foi fundamental para a qualidade de minha tese.

Aos professores Cristina Yumi Miyaki, Diogo Meyer e Maria Cristina Arias pelas sugestões enriquecedoras durante a apresentação de minha qualificação.

Aos professores Diogo Meyer, Cristina Yumi Miyaki e Nadia Moraes, pela ajuda na discussão de resultados e análises. Principalmente com a professora Nadia, que foi extremamente atenciosa e paciente ao ler e discutir o meu trabalho, e sempre disposta a ajudar.

Ao professor Naércio Menezes, pelos ensinamentos em biogeografia do Alto Paraná.

Ao professor Antonio Mateo Solé-Cava, pelos conselhos filogeográficos.

Aos professores Paulo Buckup e Marcelo Britto, do MNRJ, pela colaboração na doação de amostras de tecidos.

Aos meus colegas da UFRJ, Anderson Vilasboa de Vasconcellos, Cristiano Lazoscki, Haydée A. Cunha, com quem muito aprendi durante a fase final do meu trabalho. A dedicação desses meus colegas foi fundamental para o amadurecimento de minha tese.

A André Elias Rodrigues Soares (UFRJ) e Felipe Gobbi Grazziotin (MZUSP), que foram meus professores em inferência Bayesiana. O Felipe em especial foi também um grande conselheiro nas análises populacionais e na discussão dos resultados.

Ao Sérgio Maia Queiroz Lima, meu camarada Serginho. Um dos mais recentes professores da UFRN, sempre foi um grande amigo e colega de trabalho. O Sérgio me ensinou a fazer a maior parte de minhas análises populacionais e filogeográficas, e portanto foi extremamente importante para os resultados de meu trabalho.

Ao meu amigo, o professor Cláudio Henrique Zawadzki. O maior taxonomista que os loricariídeos já viram na história. Aprendi muito com ele sobre *Hypostomus*. Além disso, o Cláudio foi provedor de algumas das amostras mais importantes desse trabalho.

Ao meu amigo Dr. Osvaldo Oyakawa, pela convivência amistosa, pelo suporte logístico, e pelas eventuais trocas de idéias sobre peixes.

Ao Juan Camilo Arredondo, um grande parceiro e amigo, leal e solícito. Fez os mapas da minha tese e aturou momentos críticos de mau humor. Esse tá no seleto *hall* dos amigos pra vida toda já há algum tempo...

Ao meu velho amigo Daniel Fernando de Almeida, o Buda. Ele sempre aparece nos momentos mais dificeis. Me ajudou muito nas discussões de resultados, em que essa etapa parecia completamente desesperadora.

Ao meu velho amigo Flávio Lima. Figura importantíssima no meu amadurecimento profissional, com quem eu pude discutir e aprender sobre temas como filosofia da ciência, geologia e biogeografia, taxonomia de peixes (sejam eles de onde forem...) e outros assuntos mais amenos. O Flávio também contribuiu com amostras de tecidos para esse trabalho.

A minha amiga Marina Vianna Loeb, colega do MZUSP, que me trouxe amostras de *Hypostomus* do rio Grande.

Aos meus colegas de laboratório, pela convivência e troca de experiência: Allysson, Fabíola, Rodrigo, Janice e Ana Cris.

Aos meus colegas ictiólogos do MZUSP, que muito me ensinaram sobre taxonomia, sistemática e biogeografía: André Luiz Netto Ferreira, José Luiz Birindelli, Cristiano Moreira, Carine Chamon, Flávio Lima, Manoela Marinho, Marina Loeb, Ilana Fichberg, Marcelo Melo.

A dipirona sódica (minha amiga quase que diária na reta final da tese), e ao TriSorb (lubrificante oftalmológico que impediu o definhamento de meus globos oculares).

Ao Rock'n Roll e a cafeína, que me mantiveram acordado durante preciosas madrugadas de trabalho.

Ao meu amigo Rodrigo Caires, pela ajuda no campo e pelas trocas de idéia ictiológicas. Manja muito de peixe marinho esse cara!

A minha querida amiga do MZUSP, Aline Benetti, que me ajudou no trabalho de campo.

Ao meu camarada Gringo, Dr. Ricardo Arturo Guerra Fuentes, um desses caras com quem a conversa flui de um jeito que a gente chega a esquecer do trabalho, e no final descobre que aprendeu um monte de coisa sem perceber.

A Sônia Cristina da Nóbrega Carneiro dos Santos, que me forneceu amostras de tecido de *Hypostomus johni*, do rio Parnaíba.

A todos os meus colegas do MZUSP.

Agradeço também a Deisy e Helenice, Helder e Erika, Ambrosina Marciana (Zina), Ismael e Dona Isabel, pela ajuda e solicitude.

Minha família merece o maior agradecimento desse trabalho. Foi ela que construiu boa parte do pesquisador que termina esta tese. O meu pai principalmente, teve enorme participação na minha apreciação pela biologia. Ele me ensinou a ter um olhar analítico e científico, e sem dúvida nenhuma foi o principal culpado por eu me apaixonar por pescaria, mergulho, aquário, e tudo mais que tenha alguma relação com o mundo ictiológico. As minhas mães (eu tenho três!!), sempre com muito incentivo, carinho e cuidado, ajudaram a construir o Pedro Biólogo que sou hoje.

Eu certamente devo um agradecimento muito especial aos meus tios Antônio César e Marisa. Meus tios me acolheram logo quando cheguei a São Paulo. Morando na casa deles, recebi todo o carinho, generosidade, apoio e incentivo que se espera de uma boa família. Além disso, minha tia é uma ótima cozinheira, e meu tio um grande conselheiro. Foi uma época especial da minha vida que passei com eles.

Um agradecimento muito especial também pra minha Mimizinha... Sempre muito compreensiva e carinhosa durante os períodos mais difíceis do meu doutorado, ficou do meu lado em todos os momentos que eu precisei. Além disso, a Mi é a maior responsável pela arte-final da minha tese. Ela foi a única pessoa que leu meu trabalho na íntegra, três dias antes do prazo de entrega, corrigindo todos os detalhes gráficos, bibliográficos e de formatação.

Resumo	xii
Abstract	xiv
Introdução	1
Alto Paraná	2
O estado atual de conhecimento sobre o gênero Hypostomus: taxonomia, sistemática e	
biogeografia	5
O complexo de espécies Hypostomus ancistroides (Ihering 1911)	9
Sistemática filogenética, morfologia e marcadores moleculares em peixes neotropicais	11
Objetivos	16
Objetivos gerais	16
Objetivos específicos	16
Materiais e métodos	17
Obtenção de amostras	17
Localidades	18
Extração de DNA	21
Amplificação e seguenciamento do marcador molecular	22
Edição e análise das sequências	24
Escolha dos modelos de substituição nucleotídica	24
Análises filogenéticas e distâncias genéticas	25
Análises populacionais	26
Parâmetros populacionais e estruturação genética	26
Testes de neutralidade	27
Rede haplotípica	28
Amova e Samova	28
Análise dos clados hierárquicos (NCPA)	29
Resultados e Discussão	31
ATP sintase sub-unidades 6 e 8	31
Modelo Evolutivo para análises filogenéticas de Máxima Verossimilhanca	32
Filogenia	33
Distância genética	46
Estruturação populacional	49
Distribuição de haplótipos e índices de diversidade	49
Testes de Neutralidade	53
Índice de Fixação FST	54
Análise de variância molecular (AMOVA)	56
Análise de correspondência entre distribuição geográfica variância genética (SAMOVA)	60
Rede haplotípica	62
Análise dos clados hierarquizados (NCPA)	66
Dinâmica demográfica de Hypostomus ancistroides	73
Conclusões	78
Referências Bibliograficas	81
Anexos	97
Anexo I	97
Anexo II	101
Anexo III	109

# Lista de figuras

Figura 1. relações filogenéticas entre espécies de *Hypostomus* baseadas em sequências nucleotídicas de Dloop (mitocondrial) e ITS (nuclear). Retirado de Montoya-Burgos (2003).

Figura 2. Mapa da região amostrada, abrangendo as principais bacias do Alto Paraná e a bacia costeira do rio Ribeira de Iguape (legenda no alto a esquerda). Símbolos correspondem as doze localidades de coleta (legenda no alto a direita). 18

Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança com 314 taxa representando todas as sequências obtidas neste trabalho. O nome dos taxa aqui suprimidos aparecem nas árvores das próximas figuras. Modelo evolutivo GTR+G+I; log Likelihood=-8375.14; Ts/Tv=6.0480; Gamma=0.5996; invariant=0.4029; SBL=3.23711424.

Figura 4. Árvore de máxima verossimilhança com 140 haplótipos representando todas as diferentes espécies deste trabalho. Valores de *bootstrap* para 500 réplicas acima de 50% são apresentados, além do valor para o clado de *H. ancistroides* e espécies irmãs. Modelo evolutivo GTR+G+I; log Likelihood=-7703.91; Ts/Tv=6.8326; Gamma=0.5458; invariant=0.4147; SBL=2.69562917. 41

Figura 5. Árvore consensual (entre 1539) de máxima parcimônia com 140 haplótipos representando todas as diferentes espécies deste trabalho. Valores de *bootstrap* para 500 réplicas acima de 50% são apresentados, além do valor para o clado de *H. ancistroides* e espécies irmãs. Comprimento da árvore=1384; CI=0.389451; RI=0.781258. 42

Figura 6. Árvore de *Neighbor Joining*, feita a partir de matriz de distância P não corrigida, com 140 haplótipos representando todas as diferentes espécies deste trabalho. Valores de bootstrap para 500 réplicas acima de 50% são apresentados, além do valor para o clado de *H. ancistroides* e espécies irmãs. 43

Figura 7. figura 7 (próxima página): Detalhe da árvore de MV para 140 sequências. Os 48 haplótipos encontrados para *H. ancistroides* aparecem realçados com diferentes cores para os quatro filogrupos existentes. Círculos coloridos representam as localidades em que cada haplótipo foi coletado. 44

Figura 8. Árvore de *Neighbor Joining*, feita a partir de matriz de distância P não corrigida, com os 48 haplótipos representando os 162 indivíduos de *H. ancistroides* deste trabalho. Valores de 500 réplicas de *bootstrap* para NJ / MP / MV. 45

Figura 9. Mapa de distribuição dos filogrupos por localidade de coleta. Nuances de cor para os filogrupos 1 e 4 representam haplótipos mais basais ou mais derivados, de acordo com a legenda (no alto a esquerda). 46

Figura 10. Rede haplotípica de parcimônia representando 48 haplótipos de *H. ancistroides*. Legendas: cores a direita representando as doze localidades amostradas; número de indivíduos para cada haplótipo a esquerda. Alguns círculos contém o número de indivíduos para facilitar a visualização. 65

Figura 11. Rede haplotípica de parcimônia representando clados hierarquizados para análiseNCPA de 48 haplótipos de *H. ancistroides*.69

# Lista de tabelas

Tabela 1. Número de amostras de Hypostomus ancistroides utilizadas nas análisesfilogenéticas e filogeográficas, por bacia e por localidade.21

Tabela 2. Composição nucleotídica da ATP Sintase sub-unidades 6 e 8 para H. ancistroides emrelação as localidades amostradas.32

Tabela 3. Modelos de evolução nucleotídica selecionados pelo programa jMODELTEST para asdiferentes análises filogenéticas apresentadas neste trabalho.33

Tabela 4. Distâncias genéticas P entre os quatro filogrupos de *H. ancistroides*. Valores acima da diagonal representam a distância média entre filogrupos; diagonal representa a distância média para cada filogrupo; valores abaixo da diagonal representam a amplitude de variação. 48

Tabela 5. Distâncias genéticas P entre H. ancistroides e espécies filogeneticamente próximas.Valores médios intra-específicos na diagonal; abaixo, amplitude de variação.48

Tabela 6. Distribuição dos 48 haplótipos de *Hypostomus ancistroides* entre as doze localidades amostradas. Total de haplótipos (H/Lc) e o número de indivíduos (N) por localidade são mostrados na borda direita. total de localidades em que cada haplótipo é encontrado (Lc/H) e o número de indivíduos (N) representados por cada haplótipo são mostrados na borda inferior. 50

Tabela 7. Índices de diversidade haplotípica e nucleotídica em relação as populações e seusnúmeros de indivíduos e de haplótipos.53

Tabela 8. Valores dos testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu ( $F_s$ ) para as doze populaçõesde *H. ancistroides*. Valores significativos em 5% (p<0.05) marcados em cinza.</td>54

Tabela 9. Valores do índice de Fixação  $F_{st}$  para as doze populações amostradas. Escala de tons refletem a classificação de Wright (1978) quanto ao grau de divergência: (< 0.05) pouca; (0.05-0.15) moderada; (0.015-0.25) grande; (> 0.25) muito grande. (\*) não significativas em 5% (P<0.05 em 1000 permutações). 55

Tabela 10. Teste de hipóteses de estruturação populacional através de análise de variância molecular (AMOVA) com 1000 permutações, para as doze populações de *H. ancistroides*. Número de grupamentos especificados na coluna da esquerda; grupamentos testados e hipóteses formuladas *a priori*, e valores de variância nas demais colunas. Maior valor de  $\Phi_{ct}$  indicado em cinza. Valores não significativos em 5% (P>0.05) indicados com \*. 57

Tabela 11. Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) para as doze populações de *H. ancistroides*. Agrupamentos gerados pelo programa estão indicados entre colchetes.Valores de Φct acima de 50% marcados em cinza. Valores não significativos em 5% (P>0.05) indicados com \*.

Tabela 12. Relação dos haplótipos usados nas análises filogenéticas e seus códigoscorrespondentes usados na rede haplotípica.66

Tabela 13. Resultados das análises dos clados hierarquizados (NCPA) que apresentaramíndices significativos de associação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas, com asrespectivas interpretações.67

### Resumo

O gênero Hypostomus (Siluriformes: Loricariidae) com cerca de 130 espécies nominais, se destaca como um dos mais diversos e amplamente distribuídos gêneros de peixes de água doce neotropical. Devido a sua ampla distribuição e alta diversidade, os conhecimentos taxonômicos, filogenéticos e biogeográficos para as espécies do gênero são ainda consideravelmente incompletos. Consequentemente, pouco se sabe sobre processos naturais envolvidos em diversificação e variação morfológica para o gênero. Hypostomus ancistroides é uma espécie descrita para a bacia do Alto Paraná, uma eco-região hidrográfica tradicionalmente reconhecida por seu endemismo ictiofaunístico, ocorrendo também na bacia costeira do rio Ribeira de Iguape. Esta espécie apresenta considerável variação morfológica, cariotípica e isoenzimática em suas diferentes populações, sugerindo a existência de um complexo de espécies. Sua ampla área de distribuição, somada aos novos conhecimentos sobre padrões biogeográficos para diversas espécies de peixes do Alto Paraná, reforça essa possibilidade. Entretanto, a variação encontrada na morfologia das populações de H. ancistroides é ampla e contínua, impedindo que se defina diferentes espécies através das abordagens taxonômicas clássicas em ictiologia. Assim, este trabalho se propõe a utilizar ferramentas da sistemática molecular, genética de populações e filogeografia para responder questões fundamentais sobre a evolução desse potencial complexo de espécies. Sequências nucleotídicas completas do marcador mitocondrial ATP sintase (subunidades 6 e 8; 842 pb) foram obtidas para diversas espécies de Hypostomus, incluindo 162 exemplares de H. ancistroides provenientes de doze localidades abrangendo toda a sua área de ocorrência, além de outros gêneros da família Loricariidae, utilizados como grupos externos. Análises filogenéticas de Máxima Verossimilhança, Máxima Parcimônia e Neighbor Joining resultaram em topologias essencialmente semelhantes, sustentando a monofiletismo da

xii

espécie, e apontando como seus parentes mais próximos espécies de bacias hidrográficas adjacentes ao Alto Paraná. Esses resultados mostram ainda a existência de quatro filogrupos distintos para a espécie, com áreas de distribuição parcialmente sobrepostas. Análises populacionais e filogeográficas incluiram comparação de distância genética P, estruturação populacional baseada em distribuição de haplótipos e índices de diversidade, testes de neutralidade, índice de fixação F<sub>ST</sub>, análise de variância molecular (AMOVA), análise espacial de variância molecular (SAMOVA), construção de rede haplotípica de parcimônia, e análise de clados hierarquizados (NCPA). Os resultados mostram 48 haplótipos repartidos em doze populações bem estruturadas, com baixo ou nenhum fluxo gênico entre si. Eventos de expansão geográfica podem ser identificados ao longo da história demográfica, sugerindo que a estruturação encontrada atualmente reflete não só as características ecológicas da espécie, como também uma história de mudanças nas condições ambientais, eventualmente favoráveis a migração e dispersão. Contatos entre populações de diferentes bacias podem ser mais frequentes através de capturas de cabeceiras do que ao longo do corpo dos rios principais. A hipótese mais plausível para a presença da espécie na bacia do Ribeira é a de uma captura de cabeceira do alto rio Tietê. Apesar de ser formado por quatro filogrupos distintos, algumas linhagens derivadas de *H. ancistroides* apresentam sobreposição de suas áreas de distribuição. Esse contato secundário revelado apenas por um marcador de herança matrilineal impossibilita a delimitação de diferentes espécies correspondentes aos filogrupos, sob os paradigmas clássicos de especiação em peixes neotropicais.

### Abstract

The genus Hypostomus (Siluriformes: Loricariidae), comprising ca. 130 nominal species, is one of the most species-rich and widely distributed genera of neotropical freshwater fish. Because of its wide distribution and vast diversity, knowledge on the taxonomy, phylogenetic relationships and biogeography of *Hypostomus* is still severely incomplete. Consequently, little is known about the processes involved in the diversification and morphological variation for the genus. Hypostomus ancistroides is a species described from the upper Rio Paraná drainage, a freshwater ecoregion known for its ichthyological endemism, also occurring in the coastal basin of Rio Ribeira de Iguape. This species shows considerable morphological, karyotypic and isoenzimatic variation among different populations, suggesting the existence of a species complex. Its wide distribution area, coupled with recent understanding on biogeographic patterns of several fish species from the Upper Parana, reinforces that possibility. However, morphological variation in populations of H. ancistroides is wide and continuous, and does not allow recognition of potential different species by means of traditional taxonomic approaches. Thus, this paper uses tools from molecular systematics, population genetics, and phylogeography in order to answer major questions about the evolution of this potential species complex. Complete sequences of the mitochondrial marker ATP synthase (subunits 6 and 8; 842 bp) were obtained for several species of Hypostomus, including 162 specimens of *H. ancistroides* from twelve localities covering its entire area of distribution, plus other loricariid genera as outgroups. Phylogenetic analysis using methods of Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Neighbor Joining and Bayesian Inference resulted in mostly similar topologies, supporting the monophyly of the species, and showing as its closest relatives other species from river basins bordering the Upper Parana. Results

also reveal four distinct phylogroups for the species, with partially overlapping distribution areas. Population and phylogeographic analysis included comparisons of genetic distance P, population structure based on the haplotype distribution and diversity indices, neutrality tests, fixation index F<sub>ST</sub>, analysis of molecular variance (AMOVA), spatial analysis of molecular variance (SAMOVA), construction of a parsimony haplotype network, and nested clade phylogeographical analysis (NCPA). Results show 48 haplotypes distributed into twelve wellstructured populations with little or no gene flow. Geographic range expansion events can be identified along the demographic history of *H. ancistroides*, suggesting that the structure found today reflects not only the ecology of the species, but also a history of changing environmental conditions that on occasion weree favorable for migration and dispersal. Contact between populations from differente basins may be more intense through headwater stream capture than through the river channel. The most supported hypothesis for the presence of the species in the Rio Ribeira basin is a headwater capture from the upper Rio Tiete. Although *H. ancistroides* is split into four distinct phylogroups, some derived lineages of the species have overlapping distribution ranges. Such secondary contact is revealed only by a matrilineal inheritance marker and does not allow the recognition of separate species for the different phylogroups under the current paradigm of speciation and species limits in Neotropical fishes.

#### Introdução

A região Neotropical abriga a maior diversidade de peixes dulcícolas do planeta (e.g. Reis et al 2003 Cloffsca). Grande parte dessa diversificação teve início no Cretáceo, entre cerca de 120 e 100 Ma, durante o processo de separação dos atuais continentes Africano e Sul-Americano (Brito et al 2007; Albert et al 2011). Para os grupos de organismos aquáticos, os processos naturais relacionados à estruturação de corpos d'água estão intimamente ligados à sua história evolutiva. Sendo assim, para se compreender a diversificação desses grupos, uma abordagem multidisciplinar abrangendo taxonomia, sistemática e biogeografia, aliada ao conhecimento da história geológica dos continentes, representa o instrumento fundamental de estudo em evolução. Nesse sentido, nas últimas décadas, trabalhos ictiológicos para a região neotropical têm sido importantes na descrição de sua fauna, seus padrões de distribuição, e processos de especiação correlatos. Mais recentemente, com a popularização de métodos em biologia molecular, a sistemática de grupos de peixes neotropicais tem recebido importantes contribuições para o entendimento da sua história evolutiva. Além de trabalhos filogenéticos, estudos taxonômicos e filogeográficos vêm sendo amplamente aplicados para se entender processos de especiação, revelar espécies crípticas, entre outros.

Este trabalho se propõe a explorar a história evolutiva de um complexo de espécies, provavelmente monofilético, cuja área de distribuição é uma das maiores bacias hidrográficas do Brasil, com reconhecido endemismo. Trata-se de *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) (Siluriformes: Loricariidae), presente no sistema do alto rio Paraná, em todas as bacias hidrográficas que nele desaguam. Esta espécie representa um interessante objeto de estudo por algumas razões. Em primeiro lugar, análises morfológicas prévias revelam diferentes morfotipos em diferentes bacias de sua área de distribuição. Acredita-se que esses diferentes morfotipos sejam potencialmente diferentes espécies, que necessitariam ser descritas.

Resultados de observações morfológicas e de estudos moleculares sobre cariótipo e isoenzimas revelam diferenças entre as várias populações dessa espécie, sugerindo uma história de ruptura de fluxo gênico devido a um total isolamento entre elas.

Em segundo lugar, o alto rio Paraná abriga cerca de 25 espécies reconhecidas de Hypostomus (Weber 2003, e descrições subsequentes), revelando uma complexa história de processos evolutivos para o gênero nessa região. Além disso, apesar de ser considerada uma região de endemismo para alguns grupos de peixes (Britski & Langeani, 1988; Vari, 1988), existem padrões distintos de distribuição e endemismo entre as bacias hidrográficas do alto rio Paraná, para diferentes grupos taxonômicos. Este fato denota uma complexidade ainda maior para a ictiofauna da região. Potencialmente, processos colonização e dispersão de fauna entre as bacias do alto rio Paraná e bacias hidrográficas adjacentes, acompanhados de processos de especiação dentro dessa região, ocorreram nos últimos milhões de anos. Ainda, a presença de Hypostomus ancistroides também é registrada para a bacia costeira do rio Ribeira de Iguape. Esse registro é um exemplo de processos de colonização e dispersão entre diferentes bacias. No entanto, a importância relativa desses processos para a região do alto rio Paraná é ainda desconhecida. Assim, a história evolutiva do complexo de espécies Hypostomus ancistroides, deverá trazer importantes informações sobre a diversificação da ictiofauna nessa região, assim como o seu papel no estabelecimento da ictiofauna em bacias hidrográficas adjacentes.

### Alto Paraná

A bacia do rio La Plata, situada na região sudeste da América do Sul, é um dos maiores sistemas fluviais do planeta, cujas origens geológicas datam da ruptura Gondwanica durante o mesozóico (Potter 1997; Ribeiro 2006; Brea & Zucol 2011). Seus principais tributários são os

rios Paraná, Paraguai e Uruguai. O rio Paraná constitui a maior entre essas quatro bacias, com cerca de 1.400.000 km<sup>2</sup>, representando cerca de 48.7% de toda a sua área de extensão (Brea & Zucol 2011). Juntamente com o rio Paraguai, o rio Paraná encontra seus limites em uma bacia intracratônica sedimentar. A bacia do alto rio Paraná é formalmente definida como uma eco-região do rio Paraná à jusante do Salto Guaíra, (ou Salto Sete Quedas), atualmente submerso pelo lago da Usina Hidrelétrica de Itaipú desde 1982 (Britski & Langeani 1988; Abell et al 2008; Buckup 2011). Sua área de drenagem abrange uma área de aproximadamente 900.000 km<sup>2</sup>, localizada na face sul do escudo brasileiro, e abriga cerca de 250 espécies autóctones de peixes, sendo que cerca de 125 dessas espécies são endêmicas (Langeani et al 2007; Albert et al 2011). Essa riqueza de espécies corresponde a aproximadamente 6% da biodiversidade conhecida de peixes neotropicais (Albert et al 2011). Devido ao isolamento geográfico ocasionado pelo Salto Guaíra, a bacia do alto rio Paraná é tradicionalmente considerada uma região de endemismo para a ictiofauna (e.g. Géry 1969; Vari 1988; Hubert & Renno 2006). De fato, esta assertiva é válida para diversos grupos de peixes com maior mobilidade e capacidade de natação, como curimatídeos (Ostariophysi: Characiformes) (Vari 1988). No entanto, recentes trabalhos taxonômicos com diferentes grupos de peixes descrevem novas espécies de distribuição comparativamente restrita em bacias do sistema do alto rio Paraná. Como exemplo, Lophiobrycon weitzmani Castro et al 2003, Oligosarcus planaltinae Menezes & Géry, 1983, Steindachnerina corumbae Pavanelli & Britski, 1999, Hypostomus heraldoi Zawadzki, Weber & Pavanelli 2008 e H. denticulatus Zawadzki, Weber & Pavanelli 2008, são espécies restritas à bacia do rio Grande; Isbrueckerichthys calvus Jerep et al 2006 e I. saxicola Jerep et al 2006, registradas apenas no rio Tibagi, bacia do rio Paranapanema; Glandulocauda caerulea Menezes & Weitzman 2009, Rineloricaria langei Ingenito et al 2008 e R. maacki Ingenito et al 2008, e Trichomycterus

3

*igobi* Wosiacki & de Pinna 2008 e *T. crassicaudatus* Wosiacki & de Pinna 2008 são endêmicas da bacia do rio Iguaçú; *Characidium heirmostigmata* da Graça & Pavanelli 2008 é registrada apenas no rio Ivaí; entre vários outros. Esses exemplos ilustram um quadro em que diferentes padrões de distribuição biogeográfica vêm sendo reconhecidos para o sistema do alto rio Paraná, denotando uma maior complexidade na história de diversificação de sua fauna.

Outros padrões recorrentes de distribuição na região do alto rio Paraná evidenciam a importância de processos geomorfológicos na dispersão das espécies entre bacias do próprio sistema do alto rio Paraná e outras bacias adjacentes. Por exemplo, a espécie *Microglanis garavelloi* Shibatta & Benine 2005 é registrada nas porções médias e altas dos rios Paranapanema e Tietê, ambas no alto rio Paraná. Alguns taxa se restringem a apenas uma bacia hidrográfica do sistema do alto rio Paraná, porém são também registradas em bacias contíguas que não fazem parte desse sistema. *Phalloceros spiloura* Lucinda 2008 é encontrado no rio Iguaçú e bacias costeiras do leste. *Characidium xanthopterum* Silveira et al 2008 habita as bacias dos rios Paranaíba e Tocantins. O gênero *Pseudotocinclus* Nichols 1919, com três espécies descritas, se distribui pelos rios Tietê (*P. tietensis* (Ihering 1907)), Paraíba do Sul (*P. parahybae* Takako et al 2005), e Ribeira de Iguape (*P. juquiae* Takako et al 2005). *Hypostomus ancistroides*, o próprio objeto desse estudo, é também registrado para a bacia costeira do rio Ribeira de Iguape. Esses padrões são exemplos de processos dinâmicos de captura de cabeceiras e compartilhamento de fauna entre bacias.

Por apresentar uma ampla área de distribuição e considerável variação morfológica, o táxon *H. ancistroides* deve abranger mais de uma espécie relacionadas entre si, configurando, portanto, um complexo de espécies. Os padrões de distribuição e relações filogenéticas dessas

espécies podem ser representativos da história evolutiva de vários grupos de peixes dessa região.

# O estado atual de conhecimento sobre o gênero *Hypostomus*: taxonomia, sistemática e biogeografia

Com cerca de 130 espécies reconhecidas e uma estimativa de aproximadamente um terço desse total a ser ainda descrito (Weber 2003; Zawadzki et al 2010), o gênero *Hypostomus* (*sensu* Armbruster 2004) se destaca como um dos mais diversos e amplamente distribuídos grupos de água doce neotropical. Ocorre nas principais bacias cis-andinas e trans-andinas de todo o continente sulamericano, incluindo as bacias dos rios Magdalena, Atrato, e lago de Maracaibo (Armbruster 2003, 2004; Maldonado-Ocampo et al 2006). Essas espécies estão distribuídas pelos principais sistemas hídricos da região neotropical da seguinte forma: duas trans-andinas, na bacia dos rios Magdalena e Atrato, e lago Maracaibo; cinco na bacia do rio Orinoco; vinte em rios costeiros do escudo das Guianas e rio Oiapoque; treze em rios costeiro do sudeste; dezessete em rios costeiros do nordeste; uma no rio Parnaíba; vinte e oito em rios amazônicos; e quarenta e quatro em rios da bacia do Prata.

Devido a sua ampla distribuição e alta diversidade, os conhecimentos taxonômicos e biogeográficos para as espécies do gênero são ainda consideravelmente incompletos. Além disso, os escassos trabalhos existentes sobre relações filogenéticas entre espécies do gênero abrangem poucos taxa e, portanto, não são representativos de sua história evolutiva. No entanto, os trabalhos mais recentes em sistemática, que abrangem o gênero *Hypostomus*, trouxeram algumas informações importantes. Nas últimas décadas, diversos trabalhos de descrição de novas espécies (e.g. Boeseman 1968; Weber 1985; Hollanda Carvalho & Weber 2004; Armbruster & de Souza 2005; Armbruster et al 2007; Birindelli et al 2007; Jerep et al 2007; Zawadzki et al 2008; Hollanda Carvalho, Lima & Zawadzki 2010; Zawadzki, Weber &

Pavanelli 2010), revisões taxonômicas regionais (Boeseman 1968, 1969; Lilyestrom 1984; Reis et al 1990; Mazzoni et al 1994; Le Bail et al 2000; Oyakawa et al 2005), e alguns trabalhos filogenéticos (e.g. Montoya-Burgos 2003; Armbruster 2003, 2004; Armbruster & Desouza 2005) exemplificam essa mudança quanto ao conhecimento sobre gênero. Abordagens filogenéticas moleculares e morfológicas concordam quanto ao parafiletismo do gênero (Montoya-Burgos et al 1998, Montoya-Burgos 2003; Armbruster 2004), evidenciando o quanto a sistemática desse grupo necessita ainda ser estudada. Como consequência, alguns autores propuseram a sinonímia de alguns gêneros a *Hypostomus* (e.g. Armbruster 2003). Os gêneros Aphanotorulus Isbrücker & Nijssen 1983, Isorineloricaria Isbrücker 1980, Squaliforma Isbrücker & Michels 2001 (Armbruster & Page 1996, Armbruster 1998, 2004), e Cochliodon (Armbruster 1997, 2003, 2004, Montoya-Burgos et al. 1998, 2002, Weber & Montoya-Burgos 2002) seriam portanto sinônimos de Hypostomus. Desta forma, a contagem do número de espécies reconhecidas para o gênero ultrapassa 130. Porém, ainda há discordância quanto a essa decisão (e.g. Ferraris 2007). De fato, esta sinonímia proposta abrange clados notadamente monofiléticos, baseando-se em dados morfológicos (sinapomorfías osteológicas) e moleculares. O clado compreendendo os gêneros Aphanotorulus, Isorineloricaria e Squaliforma apresenta cinco sinapomorfias (Armbruster 2004), enquanto o clado abrangendo as espécies do gênero Cochliodon apresentam três sinapomorfias (Armbruster e de Souza 2005), ambos corroborados por resultados moleculares, baseados em sequências nucleotídicas de marcadores nucleares (gene ITS) e mitocondrial (região controle) (Montoya-Burgos 2003).

Por um lado, a sinonímia desses gêneros resolve o problema da parafilia de *Hypostomus*. No entanto, informações importantes sobre relações filogenéticas dentro do grupo acabam sendo

6

ignoradas. Tais gêneros sinonimizados devem aguardar uma resolução das relações filogenéticas das espécies de *Hypostomus* a fim de serem revalidados.

A ampla diversidade de formas e espécies deste gênero suscitou uma série de trabalhos exploratórios sobre sua diversidade molecular. O uso de aloenzimas tem sido aplicado com o objetivo de distinguir diferentes espécies de *Hypostomus*, principalmente na bacia do rio Paraná (Zawadzki et al 2004, 2005, 2008; Paiva et al 2005) e Paraguai (Renesto et al 2007). Estudos cariotípicos em Hypostominae revelam uma considerável amplitude no número de cromossomos (Milhomem et al 2010; Bueno et al 2011).

Baseando-se no seu padrão biogeográfico de distribuição cis- e trans-andina, pode-se deduzir que um ancestral do gênero *Hypostomus* já existia durante o Mioceno médio. Registros fósseis atribuídos a loricariídeos são conhecidos do Oligoceno tardio/Mioceno inferior (Lundberg 1997; Cione et al 2005; Malabarba & Lundberg 2007). No entanto, esse registro para a família é, em sua maioria, representado por dentes isolados ou fragmentos de espinhos, o que impossibilita a identificação ao nível genérico. Assim, não se pode estimar com alguma precisão a data de surgimento da linhagem a qual pode ser atríbuído o gênero *Hypostomus*. Por outro lado, esses fósseis mostram que um tempo mínimo para a diversificação da família coincide com o dos grupos mais importantes da atual fauna de peixes neotropical, em que uma fauna essencialmente moderna existia já durante o Mioceno médio, sendo alguns dos atuais gêneros já registrados para o Oligoceno tardio (Lundberg, 1998).

Segundo Montoya-Burgos (2003), os grandes clados de espécies de *Hypostomus* surgiram durante o Mioceno médio, entre 12 e 4 milhões de anos atrás. Baseado em sequências nucleotídicas da região de controle (mitocondrial) e ITS (nuclear), Montoya-Burgos (op. cit.) propõe uma filogenia em que linhagens monofiléticas que se diversificaram

durante esse período ocupam as mesmas bacias hidrográficas, ou bacias próximas (figura 1). A afinidade filogenética entre espécies do rio Tocantins, rio São Francisco e rio Paraná ilustra bem esse exemplo (ver clado D3; figura 1).



Figura 1: Relações filogenéticas entre espécies de *Hypostomus* baseadas em sequências nucleotídicas de Dloop (mitocondrial) e ITS (nuclear). Retirado de Montoya-Burgos (2003).

A proximidade geográfica das cabeceiras dessas três bacias está certamente implicada na monofiletismo deste clado, uma evidência de contatos pretéritos entre elas. Além disso, as espécies amazônicas do rio Tocantins formam um grupo monofilético, assim como espécies do rio São Francisco, sugerindo que processos de especiação possam ter ocorrido nessas bacias. Ainda, a formação dos grandes clados está em grande parte relacionada à grande reestruturação das bacias hidrográficas neotropicais, resultante do soerguimento final da cordilheira andina (há cerca de 10 a 8 milhões de anos). Sendo assim, é evidente o papel de mudanças paleohidrologicas miocênicas na formação da diversidade contemporânea, através de eventos de dispersão e vicariância subsequentes (Lundberg 1997; Lundberg et al 1998).

### O complexo de espécies Hypostomus ancistroides (Ihering 1911)

A espécie *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae: Hypostominae) foi descrita para a bacia do rio Sorocaba, alto rio Tietê. Posteriormente, essa espécie foi registrada para as outras duas maiores bacias do sistema hidrográfico do alto rio Paraná. São elas a bacia do rio Paranapanema e do rio Grande (Weber 2003). Recentemente, *H. ancistroides* foi também registrada na bacia costeira do rio Ribeira de Iguape, sendo, porém, sua área de distribuição restrita a áreas de baixada na porção nordeste dessa bacia (Oyakawa et al 2005). Apesar de sua área de distribuição ser formalmente definida na literatura como as bacias dos rios Paranapanema, Tietê, Grande e Ribeira de Iguape (Weber 2003), esta espécie é encontrada em todas as bacias do alto rio Paraná (Cláudio Zawadzki, comunicação pessoal).

Existem vários indícios de que o táxon *H. ancistroides* represente um complexo de espécies. Foram observadas diferenças importantes entre indivíduos de diversas populações ao longo de sua área de distribuição, que provavelmente refletem uma história de isolamento reprodutivo entre elas. Aspectos como variação em proporções corporais e no padrão de

colorido são facilmente observados (e.g. Oyakawa et al 2005). Entretanto, a larga faixa de variação morfológica existente entre indivíduos identificados como *H. ancistroides* de populações próximas impossibilita a delimitação de limites morfológicos e biogeográficos das espécies através dos métodos clássicos usadas em taxonomia de peixes. Assim, ferramentas moleculares aliadas à abordagem morfológica representam a estratégia mais lógica para se resolver os problemas taxonômicos desse complexo de espécies.

As diferenças populacionais inerentes à espécie se manifestam não apenas na morfologia externa, mas também nos aspectos celular e molecular. Alguns trabalhos citogenéticos foram realizados para a espécie. Apesar de apresentar o número de cromossomos constante (2N=68, e.g. Michelle et al 1977), diversas fórmulas cariotípicas são reportadas entre várias populações de H. ancistroides. Artoni and Bertollo (1996) reporta para o rio Mogi-Guaçu, bacia do rio Grande, a fórmula 16m+18sm+34st/a. Alves et al (2006) reporta para o rio Araquá, na bacia do rio Tietê, a fórmula 18m+10sm+12st+28a. Endo (2006) encontra três diferentes fórmulas para três populações muito próximas (i.e. cerca de 60 km entre as mais distantes), sendo duas delas no rio Pirapó, bacia do rio Paranapanema (14m+12sm+18st+24a e 16m+12sm+18st+22a), e uma no rio Ximbaúva, bacia do rio Ivaí (8m+10sm+18st+32a). Bueno et al (2011) encontra 14m+14sm+8st+32a para espécimes do rio Piriquiri, no Paraná. Segundo Bueno et al (2011), a proporção de cromossomos subtelocênticos e acrocêntricos varia entre 44% e 79% para a espécie. Tais diferenças em fórmulas cromossômicas também são reportadas para outras espécies de Hypostomus, principalmente na bacia do Alto Paraná (e.g. H. nigromaculatus (Rubert et al 2008), H. regani (Alves et al 2006), H. strigaticeps (Michelle et al 1977; Endo 2006)). Esses rearranjos cromossômicos podem ser o reflexo de um isolamento entre as diferentes populações, e podem, portanto, ser considerados um indicativo da existência de novas espécies.

Aspectos do polimorfismo genético também foram explorados para *H. ancistroides*. Através de AMOVA baseada em 76 loci polimórficos amplificados por RAPD para indivíduos de quatro populações próximas do rio Cambé (bacia do rio Paranapanema), Sofia et al (2008) inferem que o fluxo gênico entre os diferentes pontos amostrais deve ser reduzido para essa espécie. Tal resultado endossa a hipótese de que populações do gênero são, em geral, sedentárias (Zawadzki et al 2005).

Resultados sobre variabilidade genética baseados em eletroforése de aloenzimas também sugerem que populações de *H. ancistroides* possam representar diferentes espécies. Segundo Zawadzki et al (2008), *H. ancistroides* demonstrou ser a espécie de maior divergência genética dentre as dez inferidas para para 14 sistemas enzimáticos (*D*=0.839; Nei 1978).

### Sistemática filogenética, morfologia e marcadores moleculares em peixes neotropicais

Tradicionalmente, a taxonomia e a sistemática para a maior parte dos grupos animais é feita com base em observações morfológicas. O principal foco de interesse de sistematas é, de uma forma geral, a diferença em estados de caractéres fixada nas espécies (ou taxa superiores) e relações filogenéticas entre taxa terminais pré-definidos (Harrison 1998). Na sistemática de peixes, principalmente para os taxa recentes da região neotropical, essa abordagem não é diferente. Novidades em aspectos teóricos nas últimas décadas, principalmente na esfera molecular, pouco modificaram a forma de pensar e a prática ictiológica aon nível de espécie (e.g. Di Dario 2010). A simples observação de padrões para nomear espécies neotropicais ainda é encarada como a melhor forma de se abordar especiação. Na filogenia, a incorporação de dados moleculares, principalmente de sequências nucleotídicas, encontrou seu espaço mais rapidamente, com alguns trabalhos importantes durante a década de 1990 (e.g. Alves-Gomes

11

et al 1995). Como resultado, a taxonomia de peixes neotropicais se baseia no reconhecimento de um conjunto de caractéres morfológicos diagnósticos, usualmente atribuídos à especiação por segregação alopátrica (Nelson & Platnick 1981). Essa conduta é atualmente justificada pelo Conceito Filogenético de Espécie (CFE) proposto por Cracraft (1983, 1989). Este conceito é tratado também como Conceito Diagnóstico de Espécie (de Queiroz 1998, Mallet 2006). Entretanto, assumir essa conduta baseada em diagnose implica em assumir como premissa a existência de um processo envolvido na especiação, com resultados padronizados no fenótipo morfológico. Alguns autores interpretam essa diagnosabilidade como condição "necessária e suficiente" para o reconhecimento de espécies, ao invés de reconhecê-la como uma das propriedades resultantes da especiação (de Queiroz 1998). Portanto, desta premissa surgem problemas sobre as bases biológicas subjacentes ao fenótipo. Em primeiro lugar, nem sempre existe uma relação de linearidade entre a variação dos fenótipos e as unidades taxonômicas (sejam espécies ou unidades hierarquicamente superiores ou inferiores a elas) e suas relações filogenéticas. Diversos fatores, muitas vezes relacionados entre si, estão envolvidos na determinação da morfologia. Consequentemente estão implicados em mecanismos pelos quais a evolução e seleção natural atuam, como a escolha de parceiros reprodutivos, comportamento ou alimentação. Esses fatores podem ser ambientais (e.g. temperatura, alimentação), desenvolvimentais (e.g. regulação de expressão gênica, mecanismos epigenéticos, interação gênica [modularidade, epistasia, pleiotropia]), populacionais (e.g. presença de conspecíficos, tamanho populacional, proporção de indivíduos migrantes), além dos resultados de mutações genômicas (Freeland 2005; Jablonka & Lamb 2006; Gilbert & Epel 2009). Exemplos dessa não-linearidade estão presentes entre todos os grupos de organismos vivos, e vem sendo explorados através de abordagens

moleculares principalmente em aves (e.g. Phillimore et al 2008), peixes (e.g. Peichel et al 2001; Won et al 2005, 2006; Chouard 2010), e insetos (e.g. Triponez et al 2011).

O principal problema decorrente de uma premissa baseada apenas em observação de padrões é a possibilidade de erro ao se assumir quais são os processos envolvidos, sejam eles na filogenia ou na taxonomia. Para alguns casos em peixes neotropicais, os padrões de variação morfológica parecem não obedecer aos padrões comumente observados para a maior parte da ictiofauna neotropical (e.g. complexos de espécies como Astyanax gr. bifasciatus, Rhamdia gr. quelen, gêneros como Hyphessobrycon e Moenkhausia). Este parece ser também o caso de Hypostomus. O número razoavelmente alto de espécies descritas nos últimos anos para este gênero esconde problemas taxonômicos críticos a ele inerentes. As espécies reconhecidas recentemente apresentam geralmente condições únicas ou incomuns em suas morfologias e padrão de colorido, permitindo fácil diagnose. Por exemplo, H. chrysostiktos apresenta um número de raios em sua nadadeira dorsal único para o gênero (Birindelli et al 2007). H. *multidens* se distingue basicamente pela presença de uma dentição peculiar (Jerep et a 2007). H. denticulatus e H. heraldoi (Zawadzki et al 2008) são diagnosticáveis através da combinação de apenas dois caractéres. H. rhantos (Armbruster et al 2007), H. faveolus (Zawadzki et al 2008), H. kopeyaka e H. weberi (Hollanda Carvalho et al 2010) e H. peckoltoides (Zawadzki et al 2010) apresentam padrões de coloração praticamente exclusivos. Parte dessas espécies e as demais recentemente descritas pertence à linhagem do antigo gênero Cochliodon, o que restringiu o universo de comparação diagnóstica com outras espécies em mais de 80% (H. ericius, H. hemicochliodon, H. pagei, H. sculpodon [Armbruster 2004]; H. ericae, H. paucipunctatus, H. simios, H. soniae, H. waiampi [Hollanda Carvalho & Weber 2004]; H. macushi [Armbruster & de Souza 2005]). Além disso, dúvidas quanto a plasticidade fenotípica das espécies não são abordadas objetivamente (e.g. H.

*faveolus*, *H. kopeyaka*). Os maiores problemas relativos a taxonomia de *Hypostomus* residem justamente nessa plasticidade. A amplitude de variação morfológica intra- e interespecíficas se sobrepõem, trazendo uma enorme dificuldade para se estabelecer diagnoses entre espécies (Zawadzki et al 2005; 2008). A esse fato, somam-se outros problemas comuns à taxonomia, como: antigas descrições originais pouco informativas, exemplares tipos perdidos, vastas áreas inexploradas e um conhecimento incompleto das áreas de distribuição das espécies (Reis et al 1990; Oyakawa et al 2005). O resultado deste somatório de dificuldades é a virtual impossibilidade de se descrever a diversidade de *Hypostomus* e seus processos subjacentes. Assim, as linhagens de *Hypostomus* que representam os maiores desafíos quanto a interpretação de seus padrões morfológicos e processos evolutivos vem sendo deixadas de lado. Isto se aplica especialmente para *H. ancistroides* e outras espécies restritas ao Alto Paraná, cuja variação morfológica não pode ser claramente atribuída a distribuição alopatrica, uma vez que as bacias que compõe essa área de distribuição aparentemente estão conectadas desde o Mioceno (Albert & Reis 2011).

Por essas razões, o uso de ferramentas moleculares para inferir os processos relacionados à distribuição de linhagens e variação morfológica em *Hypostomus* é fundamental. Recentemente, a interface entre genética de populações e a sistemática filogenética clássica vem se constituindo como uma área de pesquisa valiosa, com o reconhecimento de que a relação entre ancestral e descendente passa obrigatoriamente pela compreensão de processos genealógicos e estrutura populacional (Avise et al 1987; Templeton 1994). A genética de populações estuda a variação intraespecífica, padrões de reticulação (isto é, cruzamento) e processos pelos quais uma linhagem origina duas outras linhagens (Harrison 1998). É justamente no estudo desses processos que a Teoria da Coalescência se torna uma ferramenta fundamental (e.g. Avise 2000). Marcadores moleculares vem sendo cada vez mais

utilizados na sistemática filogenética nas últimas décadas. Eles apresentam uma série de vantagens e desvantagens em relação aos métodos clássicos da sistemática, sumarizados por Avise (2004). Entre as vantagens, destacam-se a infinidade de dados a serem explorados, a possibilidade de identificação de eventos homoplásticos na morfologia, e a possibilidade de comparação direta entre organismos pertencentes a qualquer nível taxonômico, como espécies, famílias ou ordens diferentes.

Espera-se que, neste trabalho, o uso de ferramentas moleculares traga informações básicas sobre formação de linhagens, permitindo-se especular as razões de diversificação morfológica para *H. ancistroides*. Essas informações poderão ser importantes para a compreensão de processos evolutivos como adaptação e especiação para outras espécies de *Hypostomus* e outros grupos de peixes neotropicais.

# Objetivos

# **Objetivos gerais**

- Descrever a história populacional de *Hypostomus ancistroides*, através de análises filogenéticas e filogeográficas baseadas em sequências nucleotídicas do marcador mitocondrial ATP sintase sub-unidades 6 & 8;
- Inferir a hipótese de processos naturais inerentes a bacia do Alto Paraná relacionados a especiação e padrões biogeográficos.

### **Objetivos específicos**

- 1. Testar a hipótese de monofiletismo para as populações de *Hypostomus ancistroides* e discutir a hipótese de que o taxon constitui um complexo de espécies;
- 2. Descrever a estruturação populacional e a história demográfica de H. ancistroides;
- Inferir o fluxo gênico e capacidade de dispersão entre diferentes populações de *H*.
  *ancistroides* e testar a hipótese de que diferentes rios da bacia do Alto Paraná representem áreas de endemismo independentes para a espécie;
- Discutir as possíveis causas de variação morfológica inter- e intraespecífica do gênero Hypostomus em relação à estrutura populacional.

### Materiais e métodos

### Obtenção de amostras

Tendo em vista uma análise filogenética incluindo o máximo de espécies possíveis do gênero *Hypostomus*, a obtenção de amostras para esse estudo baseou-se em diversas viagens de campo para coleta de espécimes, e em doações e permuta com outras instituições científicas. Durante os trabalhos de campo, os exemplares capturados tinham uma amostra de tecido muscular retirada da cauda e colocada em tubos numerados de 2ml para conservação. Eventualmente, outros tecidos foram retirados experimentalmente, como nadadeiras, lábio e figado. Tais amostras foram conservadas em álcool (etanol ou isopropanol) a uma concentração entre 75% e 95%. Exemplares *vouchers*, fixados em formol e conservados em álcool 70%, foram também numerados e tombados na coleção ictiológica do MZUSP, garantindo a correspondência entre os espécimes e as suas amostras de tecido. As coletas envolvem os métodos tradicionais para captura de peixes, como puças, redes de espera e arrasto e tarrafa. Uma lista das amostras utilizadas neste trabalho encontra-se nos Anexos I e II.

A amostragem para o gênero *Hypostomus* abrange os principais sistemas hídricos da região Neotropical. Foram obtidas amostras das bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai (bacia do Prata), Ribeira de Iguape, Paraíba do Sul, São Francisco, Rio de Contas, Parnaíba (rios costeiros do sudeste e nordeste da região Neotropical), Tapajós, Tocantins, Xingu, Jari (bacia amazônica). Para *Hypostomus ancistroides*, a amostragem abrange toda a sua área de distribuição, em rios do Alto Paraná e rio Ribeira de Iguape: bacias dos rios Ribeira de Iguape, Ivaí, Paranapanema, Peixe, Tietê, Grande, Paranaíba e Paraná (figura 2).



Figura 2: Mapa da região amostrada, abrangendo as principais bacias do Alto Paraná e a bacia costeira do rio Ribeira de Iguape (legenda no alto a esquerda). Símbolos correspondem as doze localidades de coleta (legenda no alto a direita).

# Localidades

A área de distribuição da espécie é definida na literatura como Alto Paraná e Ribeira de Iguape (Weber 2003). Tal área abrange os estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Goiás. A amostragem de *H. ancistroides* nesse trabalho abrange quase a totalidade dessa área de distribuição, incluindo os principais afluentes do Alto Paraná (Anexo II). São eles os rios Ivaí, Paranapanema, Tietê, Grande e Paranaíba. Amostras dos rios do Peixe e São José dos Dourados também foram obtidas, além de amostras para a bacia costeira do rio Ribeira de Iguape.

Com o intuito de se explorar a estruturação populacional e testar hipóteses sobre fluxo gênico, as áreas amostradas foram agrupadas em doze localidades (figura 2, tabela 1). Populações são geralmente definidas como um grupo de indivíduos de uma mesma espécie potencialmente intercruzantes, vivendo em uma determinada área geograficamente restrita (Freeland 2005). Esse conceito geral atende a boa parte dos paradigmas ecológicos e evolutivos de população, baseados na ocupação de uma área geográfica por um grupo de indivíduos interagindo entre si, e com potencial intercruzamento (Waples & Gaggiotti 2006). Inicialmente, minha idéia era determinar as diferentes populações como correspondendo às diferentes bacias. Entretanto, os primeiros resultados mostraram que a distribuição geográfica de haplótipos parecia ser muito mais complexa. Assim, novas hipóteses sobre estruturação populacional foram estabelecidas, balizando os critérios para determinação dessas doze populações.

O principal critério de agrupamento foi a proximidade geográfica entre os pontos de coleta, pertencentes a uma mesma bacia hidrográfica. Desta forma, admite-se que a principal barreira para dispersão da espécie seja a distância. Esta premissa é baseada em alguns dados ecológicos publicados. Casatti et al (2005) sugere que *H. ancistroides* é uma espécie mais generalista quanto a ocupação de habitats, e tolerante quanto a sua mudança por ação antrópica. Sofia et al (2008) propõe que esta espécie apresente uma alta e estruturação populacional com fluxo gênico limitado, decorrente de hábitos sedentários comuns ao gênero. Assim, assumiu-se que a distância entre pontos de coleta seja um critério mais coerente para se estabelecer populações do que variação no habitat. Outro critério adotado para estabelecimento das doze populações nesse estudo, se baseia em hipóteses específicas de estruturação a serem testadas. Por exemplo, para se inferir fluxo gênico entre populações de diferentes pontos de uma mesma bacia, os pontos de coleta foram agrupados de forma a representas as porções altas e médias dessas bacias. Este critério foi adotado para os rios Tietê

(localidades "alto Tietê" e "médio Tietê") e Paranapanema ("alto Paranapanema" e "médio Paranapanema"). Para o rio Grande, este critério não pode ser aplicados, pois as localidades que representariam sua porção média não forneceram um número satisfatório de amostras. Assim, o rio Grande constitui uma única população neste trabalho, apesar da abrangência de suas localidades de coleta (figura 2). De forma a compensar essa resolução, que provavelmente não é adequada ao cenário geográfico real de distribuição populacional para o rio Grande, uma atenção especial foi dada as relações filogeográficas entre as amostras dessa bacia, baseada principalmente na rede haplotípica e na distribuição de haplótipos por localidade de coleta. Outras hipóteses de fluxo gênico que balizaram a determinação das populações foram: entre diferentes bacias através de contatos por cabeceiras ou mudanças de curso de tributários, e entre tributários de diferentes margens de uma mesma bacia. O número de amostras por localidade pode ser visualizado na tabela 1.
bacia	Número de amostras	localidade	Número de amostras por localidade
rio Paraná	9	Prn	9
rio Paranaíba	14	Prb	14
rio Grande	32	Grd	32
rio São José dos Dourados	4	SJD	4
nia Tiatà	22	ATie	27
rio Hete	33	MTie	6
rio do Peixe	3	Pxe	3
		APpn	4
rio Paranapanema	44	MPpnE	31
		MPpnD	9
rio Ivaí	3	Iva	3
rio Ribeira de Iguape	20	Rib	20
TOTAL	162	12	162

Tabela 1: Número de amostras de *Hypostomus ancistroides* utilizadas nas análises filogenéticas e filogeográficas, por bacia e por localidade.

# Extração de DNA

A extração de DNA total das amostras foi feita usando-se três formas diferentes ao longo desse trabalho, sendo uma delas a extração salina, e as outras duas através de kits (*Wizard Genomic DNA Purification kit* - Promega; *DNeasy Blood and Tissue kit* - Qiagen).

A extração salina seguiu o seguinte protocolo, modificado a partir de Aljanabi & Martinez (1997): i) adicionar 400  $\mu$ L de tampão salino (NaCl 0.4M, Tris–HCl 10mM pH 8.0, e EDTA 2mM pH 8.0) à amostra de tecido previamente desalcoolizada; ii) adicionar 40  $\mu$ L de SDS 20% (concentração final 2%) e 10  $\mu$ L de proteinase K 20 $\mu$ g/ $\mu$ L (concentração final 400  $\mu$ g/mL); iii) incubar a 56 °C por duas horas ou até a total digestão do tecido; iv) adicionar 300

 $\mu$ L de NaCl 6M (solução aquosa saturada de NaCl) e levar o tubo ao agitador por 30 segundos; v) centrifugar a 14.000 rpm durante 30 minutos; vi) transferir o sobrenadante para um tubo de 1.5 ml, adicionar 600  $\mu$ L de isopropanol PA, agitar levemente o tubo invertendo-o e incubar a -20 °C durante uma hora; vii) centrifugar a 14.000 rpm durante 20 minutos; viii) descartar sobrenadante, acrescentar 600  $\mu$ L de etanol 70% e centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos; ix) descartar o sobrenadante e aguardar a evaporação total do etanol; x) adicionar 50 a 100  $\mu$ L de TE, aguardar 24 horas a eluição do pellet, e estocar a -20 °C.

As extrações usando os kits seguiram os protocolos propostos pelos fabricantes, exceto pelo tempo de centrifugação nas etapas 6 e 9 para o *Wizard Genomic DNA Purification kit*, em que os tempos de centrifugação foram aumentados para 15 minutos e 10 minutos respectivamente.

#### Amplificação e sequenciamento do marcador molecular

As amplificações de sequencias nucleotídicas mitocondriais da ATP sintase sub-unidades 6 e 8 foram realizadas através de PCR em volume total de 25 µL. Tais reações utilizaram como reagentes o *PCR Master Mix* (Promega), ou *Taq DNA Polymerase (recombinant)* 500U (Fermentas) e *DNTP Mix* (Promega).

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) deste trabalho são propostos por E. Bermingham (Bermingham Lab - Smithsonian Tropical Research Institute: <u>http://</u> <u>striweb.si.edu/bermingham/research/primers/table.html</u>) e utilizados por Perdices et al (2002) para o gênero *Rhamdia* (Siluriformes, Heptapteridae): 8.2 L8331 (5' AAA GCR TYR GCC TTT TAA GC 3'; Tm 53.7 °C) e CO3.2 H9236 (5' GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC 3'; Tm 59.9 °C). As amplificações por PCR foram feitas em termocicladores de 96 poços para tubos de 0.2 ml das marcas Biometra, modelo *UnoII Thermocycler*, e ESCO, modelo *Swift maxi*. O programa utilizado seguiu os seguintes passos: i) desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos; ii) 36 a 40 ciclos de amplificação seguindo os passos a) desnaturação de um minuto a 94 °C; b) anelamento de iniciadores a temperatura entre 50 °C e 56 °C durante 40 segundos a 1 minuto; c) extensão a 72 °C durante 70 segundos; iii) extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Os resultados das amplificações foram visualizados em gel de agarose 1% corados por Brometo de Etídeo ou *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen), em transluminador UV. A eletroforése foi realizada em cuba a 8V/cm em tampão TBE 1%. O tamanho dos fragmentos amplificados e a quantidade de produto foram estimados usando-se *Gene Ruler 100BP Ladder Plus* ou *Gene Ruler 1KB Ladder*.

Os resultados das amplificações considerados positivos foram purificados usando-se *Exonuclease I, E.coli* (10u/5µL) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (1u/5µL) fabricado por Fermentas. A reação foi realizada em termociclador, a 37 °C durante 15 minutos, seguido de 85 °C durante 15 minutos.

O sequenciamento foi efetuado baseando-se no método da terminação de cadeia amplificada por dideoxinucleotídeos (Sanger et al 1977), usando sequenciadores capilares *ABI 3730 DNA Analyser* e *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) no Centro de Estudos do Genoma Humano, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-USP; <u>http://genoma.ib.usp.br</u>) ou pela empresa coreana Macrogen Inc. (<u>http://www.macrogen.com</u>).

### Edição e análise das sequências

Para edição e alinhamento das sequências, foi utilizado o programa BIOEDIT 7.0.5 (Hall 1999). Os eletroferogramas foram visualizados afim de se conhecer a confiabilidade do resultado do sequenciamento, e corrigir eventuais erros ou presença de ambiguidades em algus sítios. Para todas as sequências obtidas de cada taxon, foram feitos sequenciamentos das duas fitas do DNA (leve e pesada), usando cada um dos oligonucleotídeos iniciadores. O programa MEGA 5.03 (Tamura et al 2011) foi utilizado para explorar as sequências quanto às suas sub-unidades, seus códons iniciadores e terminadores, e sequências de aminoácidos. A conversão de sequências nucleotídicas em sequências de aminoácidos também foi usada como suporte nas decisões de edição de sequências.

### Escolha dos modelos de substituição nucleotídica

As análises usando os métodos de MV baseiam-se na probabilidade de uma hipótese relativa a uma certa topologia corresponda a realidade, dado um modelo evolutivo de substituição nucleotídica baseado no conjunto de dados utilizado. A escolha dos modelos evolutivos para análises de MV foi feita usando-se o programa jMODELTEST (Posada 2008), selecionando-se o critério de informação de Akaike (AIC; Akaike 1973). Segundo Posada & Buckley (2004), este método é vantajoso em relação aos métodos hierárquicos tradicionalmente usados (hLRT) pois possibilita múltiplas comparações simultâneas de modelos (hierarquizados ou não), além de avaliar a incerteza da seleção do modelo, através do cálculo de um índice de suporte (AIC *weight*; Burnham & Anderson 2003), baseados em cálculos sobre a diferença dos valores encontrados para cada modelo.

### Análises filogenéticas e distâncias genéticas

As análises de reconstrução foram realizadas usando os métodos de *Neighbor Joining* (NJ), Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV). Inicialmente, realizou-se uma análise de MV para 314 sequências obtidas através do trabalho de laboratório e sequenciamento, representando em sua maioria o gênero Hypostomus, além de outros taxa da família Loricariidae, e três sequências do gênero Rhamdia quelen (Pimelodidae) obtidas no Genbank (números de acesso: AY036869.1, AY036870.1, AY036871.1). Em seguida, usou-se o programa DNASP (Librado & Rozas 2009) para se explorar o número de haplótipos presente no conjunto de dados. As análises subsequentes utilizaram apenas esses haplótipos, reduzindo o número de taxa para 140. As análises usando os métodos de NJ, MP e MV foram realizadas no programa MEGA 5.03 (Tamura et al 2011) com 500 réplicas de *bootstrap*. Apenas a análise de MV utilizando 314 taxa não foi realizada com réplicas de boostrap. A inferência através do algoritmo de NJ (Saitou & Nei 1987) objetivou uma visualisação das distâncias genéticas (distância P não corrigida) entre diferentes haplótipos de mesmas espécies, entre diferentes espécies e, principalmente, entre diferentes populações de H. ancistroides. Além disso, as distâncias genéticas P entre alguns taxa discutidos nesse trabalho, foram calculadas no mesmo programa e são mostradas nesse trabalho.

As análises de MP foram realizadas usando CNI (*Close-Neighbor-Interchange*) como método heurístico de inferência de topologia, com 100 árvores randomicas iniciais, e cinco categorias *Gamma*. Essa análise partiu de uma árvore inicial gerada através dos mesmos parâmetros, exceto categoria *Gamma* (dez ao invés de cinco). A topologia resultante apresentada corresponde à árvore de consenso.

As análises de MV utilizaram o método heurístico de procura NNI (*Nearest Neighbor Interchange*; Moore et al 1973, Robinson 1971), com cinco categorias discretas de *Gamma*. Os modelo evolutivo implementado foi aquele estabelecido pelo programa jMODELTEST (Posada 2008). Assim como na análise de MP, foi usada uma árvore inicial gerada pelo método MV com os mesmos parâmetros.

#### Análises populacionais

#### Parâmetros populacionais e estruturação genética

Os parâmetros populacionais, como número de haplótipos, índices de fixação ( $F_{ST}$ ) par-a-par entre populações (Wright 1978), diversidade haplotípica (*h*), e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foram calculados no programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). O  $F_{ST}$  é considerado uma importante ferramenta em análises populacionais, com aplicações em diversas áreas como conservação ou biologia evolutiva (Meirmans & Hedrick 2011). Originalmente descrito como integrante dos coeficientes de retrocruzamento conhecidos como estatísticas F (*F-statistics*), o  $F_{ST}$  é um descritor de heterozigosidade, que está relacionado à frequência alélica em relação ao equilíbrio de Hardy-Winberg (e.g. Holsinger & Weir 2009). As estatísticas F foram posteriormente adaptado para diversos tipos de dados moleculares, como microsatélites (Rst; Slatkin 1995) e sequências nucleotídicas ( $\Phi_{st}$ ; Excoffier et al 1992). Neste trabalho,  $F_{ST}$  é usado para identificar a partição intra- e interpopulacional da diversidade genética, como indicativo migrantes e/ou fluxo gênico entre populações.

A diversidade haplotípica h é um descritor do número de haplótipos diferentes existentes, calculados neste trabalho para todas as sequencias de H. ancistroides e para cada uma das populações. Em se tratando de sequências nucleotídicas, qualquer diferença em um ou mais nucleotídeos representa um novo haplótipo. Em alguns casos, a informação sobre o número de diferenças entre haplótipos é mais importante do que determinar se as sequências são

iguais ou diferentes (Freeland 2005). Nestes casos, utiliza-se a diversidade nucleotídica  $\pi$  (Nei 1987), que se baseia na divergência média entre sequências, de forma a complementar as análises.

#### Testes de neutralidade

Com o objetivo de se detectar desvios em relação à neutralidade, foram realizados os teste de Tajima (Tajima 1989) e de Fu (Fu 1997) no programa ARLEQUIN 3.5. Tais testes são capazes de constatar se os dados observados são significativamente diferentes daqueles esperados, assumindo modelo de Wright-Fisher, onde as mutações são neutras (Fisher 1930, Wright 1931). Assim, assume-se uma hipótese nula de neutralidade que, se refutada, pode indicar a interferência de processos evolutivos nas populações em questão. Os desvios em relação à neutralidade são tradicionalmente interpretados como resultado de diversos tipos de seleção (seleção balanceadora, efeito carona [*genetic hitchhiking*], etc.) ou de mudanças na estrutura populacional (expansões, retrações, gargalos evolutivos [*bottleneck*], etc.). O índice D de Tajima tem seu cálculo baseado na distribuição de sítios segregantes e na diversidade nucleotídica. Valores superiores a zero sugerem que a população tenha sido submetida à seleção balanceadora ou um recente gargalo populacional. Valores inferiores a zero sugerem expansão populacional ou seleção purificadora.

O índice  $F_s$  de Fu é calculado a partir da distribuição haplotípica, e figura entre os mais apropriados para identificar crescimento populacional (Ramos e Rozas 2002). Valores positivos de  $F_s$  resultam de poucos alelos, e sugerem retração populacional, como em casos de gargalos evolutivos ou seleção por sobredominância (*overdominant selection*). Valores negativos de  $F_s$  são evidências de um excesso de alelos, como se espera em casos de expansão populacional recente ou efeito carona.

## **Rede haplotípica**

Uma rede de parcimônia de haplótipos foi gerada usando-se o programa TCS 1.21 (Clement et al 2000). O cálculo desta rede parcimoniosa é feito através de uma matriz de distância construída entre todos os pares de haplótipos. A probabilidade de parcimônia, como descrito por Templeton et al (1992), é calculada para todas as diferenças par-a-par, em um limite de 0.95 (95%), estabelecendo-se assim o número máximo de conexões entre haplótipos. As ambiguidades encontradas na rede foram solucionadas seguindo os critérios propostos por Crandall & Templeton (1993).

#### AMOVA e SAMOVA

Análises de variância molecular (AMOVA) foram realizadas no programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et al 2005), com 1000 permutações. A AMOVA possibilta o teste de hipóteses relativas à estruturação geográfica populacional. Esses testes são baseados na estatística  $\varphi$ , uma extensão do cálculo de F de Wright (Wright 1978) para sequências nucleotídicas. Os cálculos se baseiam numa matriz de distância entre a diversidade nucleotídica dos haplótipos. A repartição dessa diversidade entre as populações sub-populações e seus indivíduos revela a estruturação da espécie. A análise então retorna resultados em forma de um valor percentual que representa o quanto aquela partição explica a diversidade contida entre populações de um mesmo grupamento em relação aos agrupamentos ( $\varphi_{et}$ ) e ao total ( $\varphi_{st}$ ), e entre agrupamentos em relação ao total ( $\varphi_{sc}$ ). Os testes de significância envolvem permutações entre indivíduos, sub-populações e grupos de sub-populações. A análise espacial de variância molecular (SAMOVA) procura correspondência entre a distribuição geográfica, através das coordenadas geográficas de cada localidade, e a distância relativa à diversidade nucleotídica. Essa análise foi realizada no programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup et al 2002). A SAMOVA testa as melhores combinações de agrupamentos de sub-populações para todas as possíveis combinações de grupos, delimitadas pelo número de sub-populações. Neste trabalho, foram delimitadas doze populações e portanto a SAMOVA retorna resultados entre dois e onze agrupamentos.

# Análise dos clados hierárquicos (NCPA)

A partir da rede de haplótipos, foram realizadas análises dos clados hierárquicos (*Nested Clade Phylogeographic Analysis*, NCPA; Templeton 1995) usando o programa GEODIS 2.6 (Posada, Crandall & Templeton 2000). Esta análise, baseada na teoria da coalescência, permite a formulação de hipóteses envolvendo o papel de eventos históricos e fluxo gênico sobre a atual estrutura populacional. A NCPA analisa a distribuição espacial dos haplótipos e dos clados aos quais eles pertencem, através de dois índices:  $D_c$  (*clade distance*) e  $D_n$  (*nested clade distance*).  $D_c$  quantifica a distância de um haplótipo ou clado em relação ao ponto médio das distâncias entre os outros haplótipos ou clados do mesmo clado ao qual ele pertence.  $D_n$  mede a distância média dos membros de um clado hierarquizado em relação ao centro geográfico do clado hierarquizado ao qual ele pertence. Tais índices permitem vislumbrar quanto os haplótipos de um clado estão distribuídos, e o quão distantes os indivíduos de diferentes clados estão entre si dentro de um clado hierarquizado.

O uso de NCPA neste trabalho visa o teste de duas hipóteses em relação a distância de distribuição de haplótipos. A primeira considera a distância em linha reta entre as diferentes localidades. A segunda, considera a distância por água, ou seja, por dentro dos rios onde estão

as localidades. Em ambos os casos as distâncias foram calculadas plotando-se as localidades no GOOGLE EARTH e usando a ferramenta apropriada do próprio programa. Entretanto, para se estimar a distância por água, estabeleceu-se primeiro os pontos de interseção entre as localidades por dentro dos rios e bacias, e em seguida as distâncias foram estimadas entre cada localidade e sua sinterseções mais próxima, assim como entre as interseções mais próximas entre si. Assim, as estimativas de distâncias foram padronizadas para cada par de localidades. Em relação à bacia do rio Ribeira de Iguape, que não possui conexão direta com rios do Alto Paraná, a decisão de como proceder foi tomada após análise dos primeiros resultados de distribuição de haplótipos. Optou-se por calcular a distância entre a bacia (Rib) e o ponto amostral mais próximo da bacia do alto rio Tietê (ATie), que representa a localidade mais próxima com quem Rib compartilha seu único haplótipo. Maiores detalhes estão na seção Resultados deste trabalho.

A análise de NCPA é alvo de grande controvérsia no meio científico. Existem críticos ao método que afirmam que NCPA apresenta uma alta frequência de "falsos positivos" (Panchall & Beaumont 2007), e tal fato teria contribuído para o grande apelo e ampla utilização do método em diferentes grupos de pesquisa (Petit 2008). Como contraargumento a tais críticas, o criador do método Alan Templeton atribui tais resultados considerados falsos-positivos ao programa usado nas simulações de análises (Templeton 2008). Ainda, a última versão do GEODIs implementa um maior rigor estatístico ao método, em que o valor de significância de X<sup>2</sup> é submetido à correção de Dunn-Sidak. Devido a toda a controvérsia envolvida no método, os resultados desta análise são interpretados juntamente com todos os outros resultados neste trabalho. A possibilidade de testar as duas hipóteses de dispersão citadas acima fez com que, apesar de discussão sobre a validade do método, ele fosse ainda utilizado neste trabalho.

### Resultados e Discussão

Os resultados desse trabalho são apresentados e discutidos em partes, para cada uma das análises realizadas. Inicia-se por uma breve descrição do marcador utilizado, e pelas análises filogenéticas e cálculos de distância genética, a fim de responder as questões fundamentais sobre a origem do grupo em estudo. Em seguida, a partir desses resultados, define-se a área de abrangência do complexo, e estabelecendo suas populações e localidades. Finalmente, as análises populacionais e filogeográficas tentam reconstruir a dinâmica histórica das linhagens envolvidas. Encerrando a seção de Resultados e Discussão, cenários evolutivos são propostos para *Hypostomus ancistroides*.

#### ATP sintase sub-unidades 6 e 8

Foram obtidas 314 sequências da família Loricariidae, correspondendo às sub-unidade 6 e 8 da ATP sintase. As sequências de ambas as sub-unidades totalizam 842 pb. Tal comprimento é semelhante àquele encontrado em diversos grupos em Ostariophysi, como alguns gêneros de Characidae (Reeves & Bermingham 2006), *Hypopomus* e *Pimelodella* (Bermingham & Martin 1998), e *Rhamdia* (Perdices et al 2002). A sub-unidade 6 possui 684 nucleotídeos, compreendidos entre os sítios 159 e 842, produzindo uma proteína de 227 amino-ácidos, dos quais 20 foram variáveis. A sub-unidade 8 possui 168 nucleotídeos, compreendidos entre os sítios 1 e 168, produzindo uma proteína de 55 amino-ácidos, dos quais sete foram variáveis. Ambas as sub-unidades possuem ATG como códon iniciador e TAA como códon de finalização. Uma sobreposição no *frame* de leitura das sub-unidades ocorre entre os sítios 157 e 165. Isto é, o códon de finalização da sub-unidade 8 encontra-se nos sítios 163 a 165,

enquanto que o códon iniciador da sub-unidade 6 está nos sítios 157 a 159. Essa sobreposição é aparentemente uma condição ancestral em chordata, comumente descrita para diferentes grupos de peixes, incluindo diversas linhagens de Ostariophysi (exemplificadas acima), além de grupos basais em vertebrados, como Petromyzontídeos, Polypteriformes, Dipnoi e *Latimeria*, e anfioxos (Delarbre & Gachelin 1997). Para as sequências de *H. ancistroides*, a composição nucleotídica não apresentou variacão considerável entre os diferentes haplótipos (tabela 2). Os nucleotídeos C, T e A correspondem a cerca de 29% da composição, enquanto G corresponde a cerca de 12%.

Tabela 2: Composição nucleotídica da ATP Sintase sub-unidades 6 e 8 para H. ancistroides em relação as localidades amostradas.

	С	Т	А	G	
Pnb	29,44	29,02	29,60	11,94	
Grd	29,16	29,29	29,76	11,79	
SJD	29,33	29,22	29,45	12,00	
MTie	29,45	28,98	29,51	12,05	
ATie	29,48	28,95	29,61	11,96	
Pxe	28,86	29,57	29,97	11,60	
Prn	29,27	29,27	29,44	12,02	
MPpnE	29,59	28,96	29,45	11,99	
MPpnD	29,15	29,40	29,74	11,70	
APpn	29,54	28,89	29,57	12,00	
Iva	29,41	29,18	29,33	12,07	
Rib	29,45	28,98	29,57	12,00	
mínimo	28,86	28,89	29,33	11,60	
máximo	29,59	29,57	29,97	12,07	

#### Modelo Evolutivo para análises filogenéticas de Máxima Verossimilhança

As análises usando o método da Máxima Verossimilhança (MV) são realizadas através da implementação de um modelo de substituição nucleotídica. Neste trabalho, tais análises foram

realizadas em três etapas. A primeira, usando-se as 314 sequências obtidas. A segunda, usando-se apenas 140 sequências, correspondendo aos diferentes haplótipos das espécies. Ou seja, as sequências repetidas foram retiradas com o objetivo principal de diminuir o tempo da análise, mantendo as informações de variação nucleotídica em diferentes sítios para todas as linhagens em questão. A terceira análise filogenética usa 172 sequências, sendo 162 delas correspondendo aos 48 haplótipos encontrados para *H. ancistroides* (ver seção "Estruturação Populacional"), e outras dez correspondendo aos haplótipos das suas espécies irmãs. Os modelo evolutivos escolhidos pelo programa jMODELTEST (Posada 2008) usando AIC estão sumarizados na tabela 3. Para as duas primeiras análises usando MV, o modelo evolutivo selecionado foi GTR+G+I (Lanave et al 1984). Para o conjunto de dados da terceira análise, sob os mesmos parâmetros, o modelo selecionado foi TrN+G+I (Tamura & Nei 1993).

Tabela 3: Modelos de evolução nucleotídica selecionados pelo programa jMODELTEST para as diferentes análises filogenéticas apresentadas neste trabalho.

Método de análise	Número de sequências	Taxa analidos	modelo	figura/ Anexo
	314	todas as sequências	GTR+G+I	3
MV	140	todos os haplótipos	GTR+G+I	4
	172	todas as sequências de <i>H. ancistroides</i> , e haplótipos de espécies irmãs	TrN+G+I	III

## Filogenia

A análise filogenética foi realizada inicialmente para as 314 sequências de 842 pares de bases obtidas para *Hypostomus* e outros taxa da família Loricariidae, além de três sequências do gênero *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). A topologia resultante para análise de MV é mostrada na figura 3. O nome dos taxa foram omitidos para facilitar a visualização, uma vez

que o objetivo desta análise não é discutir as relações filogenéticas entre as espécies, e sim identificar os principais padrões biogeográficos inerentes ao gênero. As árvores construídas para 140 taxa representam todos os haplótipos encontrados para as diferentes espécies sequenciadas (figuras 4, 5 e 6). Em todas as análises, a topologia resultante foi essencialmente a mesma. Espécies presentes em uma mesma bacia ou em bacias próximas formam grandes grupos monofiléticos, recuperados em todas as análises, diferindo apenas nos valores de suporte por réplicas de *bootstrap*.

As analises filogenéticas mostram Hypostomus ancistroides como um grupo monofilético, relacionado à espécies habitando as bacias hidrográficas do Prata, Ribeira de Iguape e Paraíba do Sul. A estreita relação entre o Alto Paraná e as bacias do Paraíba do Sul e Ribeira de Iguape é sugerida por um padrão encontrado para grande parte dos grupos de peixes neotropicais (Albert & Carvalho 2011). As espécies que compõem esse clado são: H. commersoni, na bacia do Prata e de ampla distribuição, sendo registrado na Laguna dos Patos, rio Uruguai, e médio e baixo rio Paraná; H. boulengeri e H. piratatu, do rio Paraguai, também na bacia do Prata; H. affinis da bacia do rio Paraíba do Sul; e H. interruptus e H. tapijara, ambas espécies da bacia do rio Ribeira do Iguape. Montoya-Burgos (2003), baseado em sequências de DNA mitocondrial (região de controle) e nuclear (ITS) havia proposto uma estreita relação filogenética entre H. ancistroides e espécies dessas mesmas bacias, incluindo H. commersoni, H. affinis, H. boulengeri e outros taxa de bacias costeiras do sudeste. Ainda, baseado em relógio molecular para estes marcadores, Montoya-Burgos estima o surgimento do clado ao qual pertence H. ancistroides ao final do Mioceno, entre quatro e dez milhões de anos aproximadamente. A monofiletismo de H. ancistroides, assim como sua proximidade filogenética com as espécies H. commersoni, H. affinis, H. piratatu e H. boulengeri fora

também proposta por Martinez (2009) baseada em sequências de DNA mitocondrial (16S) e nuclear (F-reticulon-4).

O fato dessas espécies constituirem um grupo monofilético presente em bacias contíguas concorda com a hipótese proposta por Montoya-Burgos (2003), em que grandes clados de espécies deste gênero se formaram ao final do Mioceno. Neste caso, a relação entre as espécies presentes nos sistemas costeiros do sudeste do neotropico e sistema do rio da Prata, sugere que o clado tenha se formado por volta de 10 Ma, concordando com a suposta data de separação entre os antigos sistemas paleoamazônico e Paraná (Lundberg et al. 1998; Albert & Reis 2011). Segundo Ribeiro (2006), entre o Paleogeno e o Quaternário, eventos tectônicos tiveram forte influência na margem costeira do sudeste da América do Sul. Tais eventos acarretaram no recuo erosivo da margem leste da plataforma continental. Como resultado desse recuo, ocorreram eventos de captura de cabeceira de rios drenando para o interior do continente por parte de bacias costeiras. Essas capturas ocasionaram o compartilhamento de ictiofauna entre as bacias costeiras da região central-leste e diversos tributários do Alto Paraná. Esse compartilhamento de fauna é atualmente bem documentado para diversos grupos de peixes e diversos níveis taxonômicos. Entre loricariídeos, três espécies de Pseudotocinclus estão distribuídas pelos rios Paraíba do Sul (P. parahybae), Tietê e Grande (P. tietensis), e Juquiá (P. juquiae) na bacia do Ribeira de Iguape (Takako et al 2005). Diversos outros exemplos de compartilhamento de espécies entre tributários do rio Paraná e a bacia costeira do rio Guaratuba, são relatados em Ribeiro et al (2006) para Characiformes (e.g. Hyhessobrycon griemi, Hollandichthys multifasciatus), Siluriformes (e.g. Acentronichthys leptos, Schizolecis guntheri), e Gymnotiformes (Gymnotus pantherinus). Entre o rio Iguaçu e bacias costeiras da região sul do Brasil, Phalloceros spiloura (Lucinda 2008) e populações de Mimagoniates microlepis (Torres & Ribeiro 2009) exemplificam este caso. O fato de linhagens compartilhadas pertencerem a diversos níveis taxonômicos (gêneros, espécies e populações) evidencia o efeito de movimentos orogênicos ao longo de grandes períodos de tempo nos padrões biogeográficos de bacias costeiras no leste da América do Sul (Ribeiro 2006).

A relação filogenética entre os haplótipos de *H. ancistroides* pode ser melhor visualizada nas figuras 7 e 8. A figura 7 representa um detalhe da topologia encontrada na análise de MV, ressaltando também as localidades onde os haplótipos foram encontrados. A análise de NJ baseada na matriz de distância P para os 48 haplótipos é apresentada na figura 8, junto com os valores de bootstrap para os principais grupos recuperados nas análises de NJ, MP e MV. O comprimento dos ramos nesta figura permite uma melhor visualização das distâncias genéticas entre os haplótipos.

A topologia gerada na análise de MV mostra quatro linhagens de *H.ancistroides* em uma politomia de pouca resolução (figura 7). Esses quatro filogrupos são recuperados nas análises de NJ (figura 8) e MP. A primeira linhagem (filogrupo 1, *bootstrap* entre 69.5% [MV] e 71.6% [NJ]) compreende dez haplótipos assinalados para as localidades Paranaíba, Paraná, São José dos Dourados e Paranapanema (Pnb, SJD, Prn, MPpnD). Nesta linhagem, os haplótipos relativos a localidade MPpnD formam uma linhagem monofilética, expressivamente diferenciada dos outros haplótipos do mesmo filogrupo. Tal topologia sugere uma história populacional particular para os espécimes desta localidade, atualmente em isolamento geográfico e, possivelmente, sem fluxo gênico com outros haplótipos.

A segunda linhagem (filogrupo 2, Hanc\_Iva03; haplótipo H39) é composta por apenas um haplótipo do rio Ivaí. A pequena amostragem para o rio Ivaí (apenas três espécimes) não permite fazer inferências consistentes sobre um potencial filogrupo para esta bacia. De qualquer forma, o rio Ivaí apresenta dois diferentes haplótipos claramente diferenciados por longo tempo de divergência (figura 7). Sendo assim, não se pode desconsiderar a possibilidade de um filogrupo presente nesta bacia, com uma história evolutiva própria e de complexidade comparável aquela dos outros três filogrupos identificados.

A terceira linhagem (filogrupo 3, *bootstrap* entre 57.8% [NJ] e 64.4% [MP]) compreende nove haplótipos distribuídos nas localidades dos rio Grande, do Peixe e Tietê (Grd, Pxe, ATie). Os haplótipos mais inclusivos deste filogrupo pertencem ao rio Grande (Grd). Essa topologia sugere vagamente um movimento de dispersão a partir dessa bacia em direção ao rio do Peixe (Pxe) e rio Paraná (Prn).

A quarta linhagem (filogrupo 4) compreende o maior número de haplótipos (28) e se distribui por praticamente toda a área em que a espécie é assinalada. Esta linhagem é sustentada por maiores valores de *bootstrap*, entre 85.5% [MV] e 92.8% [NJ]. Os haplótipos mais inclusivos deste filogrupo estão presentes nas bacias mais ao sul da área de distribuição (rios Ivaí e Paranapanema), enquanto que os haplótipos mais derivados estão presentes nos rios mais ao norte (Tietê, Grande e Paranaíba, incluindo Ribeira de Iguape). Uma distinção entre a composição haplotípica para as partes altas e médias do rio Paranapanema é também sugerida pela topologia, sendo os haplótipos da localidade APpn integrantes do grupo mais derivado com distribuição ao norte, enquanto que os haplótipos das localidades MPpnD e MPpnE integram o grupo mais inclusivo, de distribuição ao sul.

A topologia das análises sugere uma série de eventos de expansão ou colonização pelos diferentes filogrupos ao longo de diferentes épocas. Por outro lado, as relações entre esses filogrupos não são bem definidas, aparecendo como uma politomia. Tal relação sugere que a ocupação de toda a área do Alto Paraná seja talvez decorrente de um único evento colonizador. Segundo Freeland (2005), o ordenamento dos ramos em uma árvore de genealogia de genes reflete a diferença entre eventos de dispersão e eventos vicariantes. No

37

caso de *H. ancistroides*, a diferenciação entre as quatro linhagens seria portanto o resultado de um isolamento geográfico entre elas, posterior a um amplo movimento de colonização. Casatti et al (2005) sugere que *H. ancistroides* seja uma espécie generalista quanto a ocupação de habitats. Considerando a diversidade de condições ecológicas em uma bacia de grandes dimensões como a do Alto Paraná, essa seria uma característica fundamental para a ampla dispersão de uma linhagem. Um subsequente isolamento teria levado ao monofiletismo recíproco destas linhagens. Eventos dispersivos são posteriores à formação dos filogrupos, promovidos por condições específicas em diferentes situações, e moldando os padrões de distribuição dos principais filogrupos. Aparentemente, há uma alternância temporal de condições ambientais que determinam a capacidade de dispersão da espécie.

Quanto aos padrões de distribuição dos filogrupos, há um importante elemento a ser notado (figura 7 e 9). O filogrupo 1 ocorre nos rios Paranaíba (Pnb), Paraná (Prn), São José dos Dourados (SJD) e Paranapanema (MPpnD). Suas linhagens mais derivadas se encontram restritas a MPpnD. O filogrupo 2, composto por apenas um haplótipo, apesar de não ter a sua distribuição assegurada devido ao baixo número de amostras desta bacia, aparece restrito a bacia do rio Ivaí. O filogrupo 3 ocorre nos rios Grande (Grd), Peixe (Pxe) e Tietê (ATie). O filogrupo 4, com a maior área de distribuição, ocorre nos rios Paranaíba (Pnb), Grande (Grd), Tietê (ATie e MTie), Paranapanema (APpn, MPpnD e MPpnE), Ivaí (Iva) e Ribeira de Iguape (Rib). Entre os filogrupos 1, 2 e 3, não existe nenhuma sobreposição em suas áreas de distribuição, exceto por uma única localidade em Prn, compartilhada pelas linhages 1 e 3 (figura 7 e 9). As localidades com número reduzido de amostras (MTie, APpn, SJD, Pxe e Iva) devem representar sub-amostras da composição real. Entretanto, se desconsiderarmos essa possibilidade, podemos concluir que essas três linhagens são alopátricas. O filogrupo 4, entretanto, apresenta uma discreta sobreposição a área distribuição de todas as outras três linhagens. Ainda, a topologia sugere alguma estruturação entre as linhagens deste filogrupo, com um movimento de dispersão, representado pelos haplótipos mais derivados. Um último detalhe importante sobre o filogrupo 4 é que nenhum de seus haplótipos foi registrado para o rio Paraná (Prn), ou para os rios do Peixe (Pxe) e São José dos Dourados (SJD), que são tributários menores do rio Paraná. Este fato sugere que a via de dispersão das linhagens deste filogrupo pode não ter ocorrido pelo rio Paraná, e sim por contato entre cabeceiras.

A existência de linhagens monofiléticas praticamente em alopatria sugere a idéia de que há uma segregação entre populações. Entretanto, esta idéia se contrapõe ao padrão de ampla distribuição dos filogrupos. Aparentemente, não existe uma associação geográfica entre haplótipos de uma mesma linhagem. De qualquer forma, os resultados apontam para a existência de algum fator histórico de isolamento entre populações, e uma subsequente expansão algumas linhagens formadas durante esse isolamento. Essa expansão seria responsável pelo contato secundário entre as quatro principais linhagens representadas pelos filogrupos.



Figura 3: Árvore de máxima verossimilhança com 314 taxa representando todas as sequências obtidas neste trabalho. O nome dos taxa aqui suprimidos aparecem nas árvores das próximas figuras. Modelo evolutivo GTR+G+I; log Likelihood=-8375.14; Ts/Tv=6.0480; Gamma=0.5996; invariant=0.4029.



sábado 26 de marco de 2011 de máxima verossimilhança com 140 haplótipos representando todas as diferentes espécies deste trabalho. Valores de *bootstrap* para 500 réplicas acima de 50% são apresentados, além do valor para o clado de *H. ancistroides* e espécies irmãs. Modelo evolutivo GTR+G+I; log Likelihood=-7703.91; Ts/Tv=6.8326; Gamma=0.5458; invariant=0.4147; SBL=2.69562917.



Figura 5: Árvore consensual (entre 1539) de máxima parcimônia com 140 haplótipos representando todas as diferentes espécies deste trabalho. Valores de *bootstrap* para 500 réplicas acima de 50% são apresentados, além do valor para o clado de *H. ancistroides* e espécies irmãs. Comprimento da árvore=1384; CI=0.389451; RI=0.781258.



figura 6: Árvore de *Neighbor Joining*, feita a partir de matriz de distância P não corrigida, com 140 haplótipos representando todas as diferentes espécies deste trabalho. Valores de *bootstrap* para 500 réplicas acima de 50% são apresentados, além do valor para o clado de *H. ancistroides* e espécies irmãs.



figura 7 : Detalhe da árvore de MV para 140 sequências. Os 48 haplótipos encontrados para *H. ancistroides* aparecem realçados com diferentes cores para os quatro filogrupos existentes. Círculos coloridos representam as localidades em que cada haplótipo foi coletado.



Figura 8: Árvore de *Neighbor Joining*, feita a partir de matriz de distância P não corrigida, com os 48 haplótipos representando os 162 indivíduos de *H. ancistroides* deste trabalho. Valores de 500 réplicas de *bootstrap* para NJ / MP / MV.



Figura 9: Mapa de distribuição dos filogrupos por localidade de coleta. Nuances de cor para os filogrupos 1 e 4 representam haplótipos mais basais ou mais derivados, de acordo com a legenda (no alto a esquerda).

# Distância genética

A distância genética para *H. ancistroides* apresentou uma variação consideravelmente alta se comparada as outras espécies que integram esse estudo (tabela 4). A distância máxima encontrada é 2.7% (distância P média 1.5%) entre os haplótipos H5 (ATie) e H9 (MPpnD), e entre H19 (Pnb) e H39 (Iva). Para os quatro filogrupos considerados, a distância genética média variou entre 0.5% e 0.8%; entre os filogrupos, a distância média variou de 1.6% (entre os filogrupos 1 e 2, mínimo de 1.2%, máximo de 1.8%) a 2.3% (entre os filogrupos 2 e 4,

mínimo de 1.8%, máximo de 2.3%). Esses valores são relativamente altos se comparados à distância P entre outras espécies de *Hypostomus* utilizadas nestre trabalho. O clado que inclui as espécies *H. ancistroides*, *H. commersoni*, *H. affinis*, *H. tapijara* e *H. interruptus* apresenta distâncias inter-específicas inferiores à variação intra-específica encontrada para *H. ancistroides* (tabela 5). A distância entre *H. commersoni* e *H. ancistroides* varia entre 0.7% e 2.7%. Entre *H. commersoni* e *H. tapijara*, a diferença encontrada varia entre 0.5% e 0.6%. Entre *H. tapijara* e *H. ancistroides*, varia entre 1.0% e 2.4%.

Em relação a outras espécies do gênero, não integrando o clado em questão, esse padrão se repete. Entre as espécies *H. agna*, endêmica da bacia do Ribeira, e *H. luetkeni*, da bacia do Paraíba do Sul, a distância é de 1%. Entre *H. mutucae* e *H. latirostris*, ambos endêmicos da bacia do rio Paraguai, essa distância está entre 1.7% e 1.8%. Considerando o complexo de espécies *H. emarginatus*, a distância média é de 0.4% entre os seus quatro haplótipos provenientes dos rios Teles Pires e Jamanxim (bacia do rio Tapajós). Um valor semelhante (0.4%) de variação intra-específica foi relatado para a região controle do DNA mitocondrial de *H. watawata*, presente em todas as bacias do escudo Guianense (Montoya-Burgos 2003).

Comparando-se os valores de distância entre os diferentes filogrupos com a amplitude de variação intra- e inter-específica dentro do gênero, nota-se que as quatro diferentes linhagens de *H. ancistroides* podem perfeitamente representar diferentes espécies. Esses valores, juntamente com a topologia encontrada nas filogenias, sugerem processos de especiação por alopatria inerentes ao Alto Paraná.

Tabela 4: Distâncias genéticas P entre os quatro filogrupos de *H. ancistroides*. Valores acima da diagonal representam a distância média entre filogrupos; diagonal representa a distância média para cada filogrupo; valores abaixo da diagonal representam a amplitude de variação.

	filogrupo 1	filogrupo 2	filogrupo 3	filogrupo 4
filogrupo 1	0,8%	1,6%	1,7%	2,1%
filogrupo 2	1.2%-1.8%	x	1,9%	2,3%
filogrupo 3	0.8%-2.4%	1.3%-1.5%	0,5%	2,0%
filogrupo 4	1.3%-2.7%	1.8%-2.3%	1.2%-2.7%	0,8%

Tabela 5: Distâncias genéticas P entre *H. ancistroides* e espécies filogeneticamente próximas. Valores médios intra-específicos na diagonal; abaixo, amplitude de variação.

	H. ancistroides	H. boulengeri	H. commersoni	H. affinis	H. tapijara	H. interruptus
H. ancistroides	1,46%					
H. boulengeri	1.5%-3.1%	0,40%				
H. commersoni	0.7%-2.7%	1.4%-1.8%	0,18%			
H. affinis	1.8%-3.2%	1.8%-2.0%	1,57%	0,24%		
H. tapijara	1.0%-2.4%	1.2%-1.4%	0.5%-0.6%	1,30%	X	
H. interruptus	1.3%-2.7%	1.4%-1.7%	1.8%-1.9%	1,50%	0,70%	X

### Estruturação populacional

## Distribuição de haplótipos e índices de diversidade

As 162 sequências de 842 pb, representando as sub-unidades 6 e 8 dos genes mitocondriais da ATP sintase apresentaram 48 haplótipos, 72 sítios variáveis (47 informativos para parsimônia e 25 singletons). O número de haplótipos por localidade variou de 1 (SJD e Rib) a 13 (Grd). As sequências apresentam diversidade haplotípica (Hd) 0.8996, e nucleotídica ( $\pi$ ) 0.01165. A diversidade haplotípica intrapopulacional variou entre 0.00 (SJD e Rib) e 0.972 (Prn); a diversidade nucleotídica variou entre 0.000 (SJD e Rib) a 0.014 (Iva).

O número de localidades em que cada haplótipo ocorreu variou entre um (para vários haplótipos) e quatro (H2 e H3). Entre os 48 haplótipos, H2 foi o mais comum, encontrado em 35 indivíduos de quatro localidades (Pnb=3, Grd=7, ATie=5, Rib=20). Em seguida, H3 apresenta uma representatividade semelhante, tendo sido encontrado em 29 indivíduos de quatro localidades (Pnb=6, Grd=3, ATie=17, APpn=3). H8 e H11 também apresentam uma representatividade considerável, sendo o primeiro encontrado em 20 indivíduos de duas localidades (MPpnE=17, MPpnD=3), e o segundo, encontrado em 13 indivíduos de três localidades (Grd=10, Pxe=2, Prn=1). Os demais haplótipos estão em sua maioria restritos a uma única localidade, sendo encontrado em um ou dois indivíduos (exceto H14, H44 e H46; ver tabela 6). O número de haplótipos por localidade variou entre um (SJD e Rib) a 13 (Grd).

Tabela 6: Distribuição dos 48 haplótipos de *Hypostomus ancistroides* entre as doze localidades amostradas. Total de haplótipos (H/Lc) e o número de indivíduos (N) por localidade são mostrados na borda direita. Total de localidades em que cada haplótipo é encontrado (Lc/H) e o número de indivíduos (N) representados por cada haplótipo são mostrados na borda inferior.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	4 H1	5 H16	5 H17	H18	HI	9 H	20	H21	H22	H23	H24
Pnb		3	6														2	1	1						
Grd		7	3								1										1	2			1
SJD																									
Mtie																									
Atie	2	5	17	1	1																				
Pxe											2	1													
Prn										1	1													1	
Mppne								17					2	6	1	1									
Mppnd						2	1	3	2														1		
Appn			3																						
Iva																									
Rib		20																							
Lc/H	1	4	4	1	1	1	1	2	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1
Ν	2	35	29	1	1	2	1	20	2	1	4	1	2	6	1	1	2	1	1		1	2	1	1	1
H25 H2	6 H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43 I	144 H	ł45	H46	H4	7 H4	48 H	[/Lc	N
																						1	1	6	14
1	1			1	1	1	1														2	_		13	32
																				4		_	_	1	4
																	1	4	1			_	_	3	6
		1																	_			_	_	6	27
														1	1	2			_			+	_	2	3
								1	1	1	1			1	1	2				I		-		8	9
								1	1	1	1											-		5	9

2 1

1 1 1

1 4 1

1 1 1

1 1 1 1 1

 $1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1$ 

2 1

Os índices de diversidade haplotípica (h) para cada localidade foram altos (acima de 0.5), exceto para APpn (0.500 +/- 0.265; quatro indivíduos e dois haplótipos), e SJD e Rib (0.00, ambas com apenas um haplótipo) (tabela 7). Este índice se baseia na probabilidade de dois alelos amostrados aleatoriamente serem diferentes (Nei 1973). Assim, localidades com um baixo número de amostras podem apresentar tanto valores artificialmente reduzidos ou elevados, dependendo do número e frequência de haplótipos. Nesses casos, há uma alta probabilidade da diversidade haplotípica do local não ter sido amostrada. Haplótipos que porventura existam mas que não tenham sido registrados podem, por exemplo, deixar nas análises sinais semelhantes aos de eventos de extinção. Esse é provalmente o caso do rio Ivaí (Iva). A presença de apenas dois haplótipos (H38 e H39) entre três amostras indica uma alta diversidade haplotípica que pode tanto ser real ou não. De qualquer forma, a posição filogenética desses haplótipos, pertencendo a diferentes filogrupos, sugere a existência de um padrão semelhante ao de outras localidades habitadas por diferentes filogrupos. Este parece ser também o caso das localidades Pxe, MTie e APpn, com valores de h 0.67, 0.60 e 0.5 respectivamente. O rio São José dos Dourados (SJD) também não apresenta uma amostragem conclusiva. No entanto, o fato de apenas um haplótipo ter sido coletado resulta num valor para *h* de 0.0.

Por se basear fundamentalmente na frequência dos diferentes haplótipos, o índice de diversidade haplotípica pode rapidamente se aproximar de 1.0 se houver um grande número de indivíduos com haplótipos exclusivos (Freeland 2005). Isto é algo relativamente comum para genomas mitocondriais de animais, cujas taxas de evolução são relativamente altas. Assim, o índice de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) permite uma interpretação complementar àquela fornecida por *h*. Esse índice tem seu cálculo baseado na quantidade média de divergência nucleotídica entre sequências. Para as populações desse estudo, os valores de  $\pi$ 

foram em geral altos, alcançando 1.4% (tabela 7). Segundo Grant & Bowen (1998), valores de h acima de 0.5 são considerados altos, e são interpretados de duas formas distintas, de acordo com a diversidade nucleotídica. Valores de  $\pi$  acima de 0.5% são considerados altos, e combinados com alta divergência gênica, representam populações grandes e estáveis, com longa história evolutiva ou contato secundário entre diferentes linhagens. Valores de  $\pi$ reduzidos (abaixo de 0.5%) associados a altos valores de *h*, são indicativos de um acúmulo de mutações após um evento de gargalo populacional seguido de um rápido crescimento populacional. A combinação de altos valores para h e  $\pi$  é encontrada para as localidades Pnb, Grd, Prn e MPpnD. De fato, as populações residentes nessas localidades parecem apresentar uma longa história evolutiva, de acordo com os resultados filogenéticos. Além disso, a distribuição geográfica de haplótipos pertencentes a diferentes filogrupos, endossa a hipótese de contato secundário entre diferentes linhagens (figura 7). Para as localidades ATie e MPpnE, as análises geraram altos valores de h e baixos valores de  $\pi$ , sugerindo expansão populacional após evento de retração. Esses índices para a localidade referente ao rio Ribeira de Iguape (Rib) retornaram valores iguais a 0.0, resultantes da amostragem de apenas um haplótipo. Ao contrário de SJD, esses valores não podem ser atribuídos a uma pequena amostragem. Um total de vinte exemplares, provenientes de duas coletas em épocas e locais distintos, devem ser representativos da diversidade local. Considerando os conhecidos eventos de contato reportados para rios das vertentes leste e oeste da Serra do Mar, é provável que essa bacia tenha capturado cabeceiras do rio Tietê que circundam a região de coleta. Além disso, H. ancistroides é encontrado apenas numa área restrita dessa bacia costeira, em sua porção norte (Oyakawa et al 2005). Essa distribuição restrita pode ser resultado de uma colonização recente, em que a nova população não teve tempo de se expandir geográficamente pela nova bacia, ou de fixar novos e exclusivos haplótipos.

	Número de	Número de	diversidade	diversidade			
	indivíduos	haplótipos	gênica (h)	nucleotídica ( $\pi$ )			
Pnb	14	6	0.791+/-0.089	0.007+/-0.004			
Grd	32	13	0.857+/-0.044	0.012+/-0.006			
SJD	4	1	0.00+/-0.00	0.00+/-0.00			
MTie	6	3	0.600+/-0.215	0.002+/-0.001			
ATie	27	6	0.581+/-0.098	0.004+/-0.002			
Pxe	3	2	0.667+/-0.314	0.001+/-0.001			
Prn	9	8	0.972+/-0.064	0.012+/-0.007			
MPpnE	31	9	0.673+/-0.083	0.002+/-0.001			
MPpnD	9	5	0.861+/-0.087	0.012+/-0.007 0.001+/-0.001			
APpn	4	2	0.500+/-0.265				
Iva	3	2	0.667+/-0.314	0.014+/-0.011			
Rib	20	1	0.00+/-0.00	0.00+/-0.00			
média	13,5	4,8	0,597	0,01165			

Tabela 7: Índices de diversidade haplotípica e nucleotídica em relação as populações e seus números de indivíduos e de haplótipos.

# Testes de Neutralidade

Os testes de neutralidade (tabela 8) não tiveram valores significativamente diferentes de zero para a maior parte das localidades. Isso indica que a hipótese nula de neutralidade das populações não pode ser rejeitada. Apenas para ATie (-1.6653; P=0.210) e MPpnE (-1.8812; P=0.0120) os valores foram significativos para D do teste de Tajima, num nível de 5%. Valores negativos para D no teste de Tajima indicam expansão populacional para populações cujo marcador não está sob efeito de seleção. Esses resultados concordam com os índices de diversidade gênica e nucleotídica, que sugerem um cenário de expansão populacional após um evento de retração para as localidades ATie e MPpnE.

localidade	Tajima D	Р	Fu Fs	Р
Pnb	0,1173	0,6080	2,1818	0,8580
Grd	1,7199	0,9660	1,5772	0,7620
SJD	0,0000	1,0000	х	х
MTie	-0,6761	0,3540	0,5399	0,5580
ATie	-1,6653	0,0210	1,9531	0,8320
Pxe	0,0000	0,9870	0,2007	0,4050
Prn	-0,0228	0,5020	-1,0658	0,2310
MPpnE	-1,8812	0,0120	-2,5870	0,0530
MPpnD	1,7280	0,9810	3,0275	0,9230
APpn	-0,6124	0,3760	0,1719	0,3550
Iva	0,0000	0,6760	4,4998	0,9530
Rib	0,0000	1,0000	Х	Х

Tabela 8: Valores dos testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (F<sub>s</sub>) para as doze populações de *H. ancistroides*. Valores significativos em 5% (p<0.05) marcados em cinza.

# Índice de Fixação F<sub>ST</sub>

Os valores encontrados de F<sub>ST</sub> foram de uma forma geral muito elevados. De acordo com os critérios propostos por Wright (1978), os valores de divergência podem ser classificados da seguinte forma: entre 0.00 e 0.005, baixa; entre 0.05 e 0.15, moderada; entre 0.15 e 0.25, alta; maior que 0.25, muito alta. Quase todos os valores encontrados de divergência entre pares de populações são portanto muito altos. Alguns valores (oito) apresentam forte divergência, enquanto apenas um apresenta uma divergência moderada. Entre os valores que apresentam fraca divergência, envolvendo as localidades Pnb, ATie e APpn, nenhum deles foi significativo em 5%. Esse valores podem ser visualizados na tabela 9.

Os altos índices de divergência supõem uma forte estruturação populacional, com baixo fluxo gênico entre diferentes localidades. Por um lado, esses valores refletem o elevado

número de haplótipos exclusivos de certas localidades. Entretanto, existem haplótipos de ampla distribuição, como H2 e H3, que sugerem a existência de migrantes, o que implicaria em fluxo gênico e consequentemente valores mais baixos de divergência.

Uma possível explicação para os resultados com valores tão altos de  $F_{ST}$  é o fato de que as diferentes populações são constituídas por haplótipos provenientes de diferentes filogrupos. A alta divergência revelada nos valores de  $F_{ST}$  seria portanto inerente as localidades. Em outras palavras, esses valores resultam da sobreposição da área de distribuição geográfica encontrada para as diferentes linhagens.

Tabela 9: Valores do índice de Fixação  $F_{ST}$  para as doze populações amostradas. Escala de tons refletem a classificação de Wright (1978) quanto ao grau de divergência: (< 0.05) pouca; (0.05-0.15) moderada; (0.015-0.25) grande; (> 0.25) muito grande. (\*) não significativas em 5% (P<0.05 em 1000 permutações).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Pnb	0											
2	Grd	0,24	0										
3	SJD	0,69	0,48	0									
4	Mtie	0,13	0,36	0,95	0								
5	Atie	0,05*	0,35	0,83	0,17	0							
6	Pxe	0,71	0,18*	0,98	0,94	0,83	0						
7	Prn	0,40	0,23	0,22	0,58	0,61	0,43	0					
8	Mppne	0,62	0,50	0,89	0,81	0,70	0,89	0,57	0				
9	Mppnd	0,47	0,38	0,46	0,62	0,66	0,56	0,22	0,68	0			
10	Appn	0,01*	0,31	0,99	0,47	-0,08*	0,97	0,53	0,80	0,57	0		
11	Iva	0,38	0,25	0,65	0,63	0,62	0,61	0,18*	0,66	0,30	0,56	0	
12	Rib	0,27	0,47	1,00	0,61	0,24	1,00	0,78	0,87	0,80	0,94	0,88	0

# Análise de variância molecular (AMOVA)

Hipóteses definidas *a priori* sobre possíveis estruturas populacionais foram testadas em diferentes agrupamentos de AMOVA. Basicamente, essas hipóteses representam possíveis vias de fluxo gênico entre as doze populações deste trabalho. As potenciais vias de contato são i) entre populações de uma mesma bacia ii) entre populações de bacias hidrográficas próximas, em suas porções altas e médias, através de contatos esporádicos entre tributários e cabeceiras dos rios; iii) entre populações de diferentes margens de uma mesma bacia hidrográfica; iv) através de longas distâncias, por dentro dos rios, principalmente através do rio Paraná, conectando bacias hidrográficas distantes. Tais hipóteses foram testadas estipulando-se as diferentes estruturas populacionais mostradas na tabela 10.
Tabela 10: Teste de hipóteses de estruturação populacional através de análise de variância molecular (AMOVA) com 1000 permutações, para as doze populações de *H. ancistroides*. Número de grupamentos especificados na coluna da esquerda; grupamentos testados e hipóteses formuladas *a priori*, e valores de variância nas demais colunas. Maior valor de  $\Phi_{CT}$  indicado em cinza. Valores não significativos em 5% (P>0.05) indicados com \*.

no. gr.	grupos	hipótese	Фст	Φst	Φsc
11	(MTie+ATie)	i	49,62*	4,34	46,05
9	(MTie+ATie) (MPpnE+MPpnD+APpn)	i e iii	6,12*	47,65	46,23
8	(MTie+ATie) (MPpnE+MPpnD+APpn+Prn)	i	9,73	44,29	45,98
11	(ATie+APpn)	ii	58,59	-4,70	46,12*
10	(ATie+APpn) (MPpnE+MPpnD)	ii e iii	8,05*	45,70	46,25
9	(ATie+APpn) (MPpnE+MPpnD+MTie)	ii e iii	-0.89*	54,49	46,40
5	(Pnb+Grd+Rib+ATie+MTie+APpn) (MPpnE+MPpnD+Prn)	iv	32,00	27,83	40,17
6	(Pnb+Grd+ATie+MTie+APpn) (MPpnE +MPpnD+Prn)	iv	38,93	18,62	42,44
7	(Pnb+Rib+ATie+MTie+APpn) (MPpnE+MPpnD)	iv	40,61	16,52	42,87
5	(Pnb+Rib+ATie+MTie+APpn)(MPpnD +MPpnE+Prn+SJD)	iv	33,18	24,06	42,76

Os resultados mostrados na tabela evidenciam altos valores de divergência entre populações de um mesmo grupo ( $\Phi_{SC}$ >40%). Os valores de diferença entre os grupos determinados ( $\Phi_{CT}$ ) foram altos em alguns casos, porém inferiores aos valores de  $\Phi_{SC}$ . Exceto em um caso, onde agrupou-se as localidades das porções altas dos rios Tietê e Paranapanema (ATie e APpn), o valor de  $\Phi_{CT}$  foi maior do que o de  $\Phi_{SC}$  ( $\Phi_{CT}$ =58.59%).

Para a hipótese (i), testou-se agrupamentos entre as porções altas e médias dos rios Tietê e Paranapanema. Os valores de  $\Phi_{CT}$  foram baixo ou não significativos. Há uma concordância entre esse resultado e a distribuição de haplótipos. De fato, essas regiões também não apresentam haplótipos compartilhados, o que reforça a hipótese de isolamento entre populações ao longo dos rios. Este tipo de isolamento pode ser um reflexo das condições ecológicas da espécie. Segundo Castro & Casatti (1997), *H. ancistroides* é uma espécie típica de riachos ou rios de pequeno porte. Casatti et al. (2005) relaciona a espécies a habitats de baixa correnteza. Esses talvez sejam fatores limitantes para a dispersão de *H. ancistroides* por rios maiores. No entanto, para o rio Tietê, o valor de  $\Phi_{CT}$  é alto (49.62%), sugerindo alguma relação entre as porções alta e baixa dessa bacia. A não significância deste valor se deve provavelmente ao baixo número amostral de MTie, mas a hipótese de fluxo gênico entre essa localidade e ATie não pode ser descartada.

Em relação a hipótese (ii), o maior valor de  $\Phi_{CT}$  encontrado (58.59%) corresponde ao grupamento entre porções altas dos rios Tietê e Paranapanema, sugerindo um contato entre essas regiões e reforçando a idéia de fluxo gênico entre populações de bacias próximas. Por outro lado, grupamentos envolvendo as porções médias entre essas bacias não tiveram resultados significantes como estruturação populacional. Ao se adicionar à estrutura, um agrupamento entre as localidades MTie, MPpnE eMPpnD, o índice de  $\Phi_{CT}$  é reduzido a valores não-significativos em um nível de 5%. A não-significância destes valores pode estar atrelada ao reduzido número de amostras para as localidades APpn e principalmente de MTie. De qualquer forma, a distribuição de haplótipos entre as localidades não sugere nenhum contato entre o médio rio Tietê e médio rio Paranapanema. Assim, os resultados quanto a hipótese (ii) sugerem que contato entre cabeceiras ou partes altas dos rios representam um cenário mais realístico do que contatos entre cabeceiras ou tributários das porções médias de bacias.

Para a hipótese (iii) de contato entre diferentes margens de uma mesma bacia, os valores de  $\Phi_{CT}$  para estruturas propostas incluindo as localidades MPpnD e MPpnE não a sustentam. Apesar dessas localidades compartilharem haplótipos, sugerindo tal via de contato entre populações, outros fatores podem contribuir para a não sustentação da estrutura da AMOVA. A maior frequência de haplótipos de MPpnD é de indivíduos pertencentes ao filogrupo 1, ao passo que a maior frequência de haplótipos de MPpnE é de indivíduos pertencentes ao filogrupo 4. Como resultado, a diversidade nucleotídica entre indivíduos dessas localidades é alta, e valores de  $\Phi_{CT}$  tendem a ser baixos, ao passo que valores de  $\Phi_{ST}$  tendem a ser altos. Portanto, a hipótese (iii) de contato entre populações de margens opostas de uma bacia hidrográfica de grande porte não pode ser descartada.

Quanto a hipótese (iv), de contato através de longas distâncias, os valores de  $\Phi_{CT}$ entre 32% e 41% sugerem, a princípio, que haja uma estruturação abrangendo localidades amplamente distribuídas. Entretanto, esses valores são inferiores aos de  $\Phi_{SC}$ , que variaram entre 40% e 43%, e representam a variância entre populações dos grupamentos propostos. Estes resultados podem ser interpretados com base nas relações filogenéticas e padrões de distribuições dos haplótipos. Os filogrupos revelados nas filogenias apresentam áreas de distribuições relativamente amplas, o que certamente deixa um sinal na distribuição das diversidades nucleotídicas entre localidades afastadas, revelados nos valores de  $\Phi_{CT}$ . No entanto, o fato de que a maior parte das localides é constituída por mais de um filogrupo resulta em valores de  $\Phi_{SC}$  elevados. Isto é, a população relativa a uma certa localidade é composta por indivíduos pertencentes a linhagens distantes, fazendo com que a variância da diversidade nucleotídica seja alta. Portanto, as estrutura testadas para a hipótese (iv) sustentam a idéia de algum contato de longa distância, proveniente de eventos antigos de expansão populacional e estabelecimento da espécie ao longo das bacias do Alto Paraná.

# Análise de correspondência entre distribuição geográfica variância genética (SAMOVA)

A análise de SAMOVA relaciona a divergência genética com a distribuição geográfica, explorando e otimizando todas as possibilidades de agrupamentos das populações prédefinidas. Os resultados da SAMOVA estão na tabela 10. Os agrupamentos com valores de  $\Phi_{CT}$  superiores a 50% estão marcados em cinza. O resultado de onze grupos foi o que obteve o maior valor (58.59%) da partição de variância genética entre grupos. Para esse resultado, o único agrupamento de localidades corresponde às porções altas das bacias dos rios Paranapanema e Tietê (APpn e ATie). A hipótese de contato entre as porções altas dos rios Tietê e Paranapanema concorda com a estrutura testada por AMOVA. Além disso, o fato de outras localidades não se estruturarem concorda com os altos valores de F<sub>ST</sub>, sustentando a hipótese de baixo fluxo gênico entre diferentes localidades. Em seguida, o resultado com sete agrupamentos apresenta um valor considerável de particionamento da variância genética (52.24%). As localidades agrupadas foram [Prn+Iva] e [Pnb+MTie+ATie+APpn+Rib]. O agrupamento proposto entre os rios Paraná e Ivaí faz pouco sentido devido ao reduzido número de amostras dessa última bacia. A proximidade filogenética entre os haplótipos Hanc Iva01 e Hanc Ppn08, Hanc Ppn39 e Hanc Ppn40, todos do filogrupo 4, deve ser responsável por esse resultado. O agrupamento seguinte inclui as cabeceiras dos rios Paranapanema e Tietê, Ribeira de Iguape, além do médio rio Tietê e rio Paranaíba. Como mencionado anteriormente, o haplótipo da bacia do Ribeira é provavelmente proveniente de uma captura de cabeceira do rio Tietê. As localidades ATie, APpn e Rib aparentemente tiveram fluxo gênico recente. O fato da localidade MTie integrar esta estruturação está ligada ao estreito relacionamento filogenético de seus haplótipos com aqueles da localidade ATie e APpn. Assim, a hipótese (i) testada na AMOVA que não havia se confirmado devido ao valor

não significativo de  $\Phi_{CT}$ , é sustentada pela análise de SAMOVA. Quanto ao rio Paranaíba, alguns dos haplótipos dessa localidade são próximos filogeneticamente de haplótipos das localidades ATie, APpn, MTie e Rib. Os haplótipos Hanc Tie02 e Hanc Tie04 são inclusive compartilhados por essas localidades (figura 7). Apesar da distância geográfica entre Pnb e outras localidades desse grupamento ser significativamente grande (cerca de 400 km em linha reta), o resultado sugere que haja alguma relação entre essas localidades. As possíveis vias de contato entre populações tão distantes poderiam ser por contato entre cabeceiras ou por dentro dos rios principais. Os resultados anteriores apontam para uma baixa capacidade de dispersão de *H. ancistroides* pelos rios, enquanto que contatos entre cabeceiras representa um cenário mais plausível. No entanto, entre as bacias do Tietê e Paranaíba existe a bacia do rio Grande, onde ocorrem haplótipos compartilhado ou filogeneticamente próximos aos das localidades desse grupamento. A princípio, o rio Grande deveria integrar essa estrutura. Porém, outros haplótipos dessa localidade são distantes filogeneticamente, fazendo parte do filogrupo 3. Esse distanciamento filogenético deve ser a causa pela qual a SAMOVA não inclui Grd nesse grupamento. Sumarizando os resultados, a SAMOVA indica uma região com algum fluxo gênico entre localidades, que abrange os rios Paranapanema, Tietê, Paranaíba e Ribeira de Iguape. A via de contato mais plausível para esse cenário é através de contatos entre cabeceiras de rios tributários às essas grandes bacias.

Tabela 11: Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) para as doze populações de *H. ancistroides*. Agrupamentos gerados pelo programa estão indicados entre colchetes. Valores de  $\Phi_{CT}$  acima de 50% marcados em cinza. Valores não significativos em 5% (P>0.05) indicados com \*.

no. de grupos	Agrupamentos		
2	[SJD] [Pnb+Grd+Mtie+Atie+Pxe+Prn+MPpnE+MPpnD+APpn+Iva+Rib]	40,20*	
3	[Pnb +Mtie+Atie+APpn+Rib] [Grd+SJD+Pxe+Prn+MPpnD+Iva] [MPpnE]	35,98	
4	[Pnb +Mtie+Atie+APpn+Rib] [Grd] [SJD+Pxe+Prn+MPpnD ] [MPpnE+Iva]	40,83	
5	[Mtie+Atie+APpn+Rib] [SJD+Prn] [Pnb+Grd+Pxe] [MppnD] [MPpnE+Iva]	38,87	
6	[MppnE+Iva] [Atie+APpn+Rib] [SJD] [Mtie] [Pnb+Grd+Pxe] [Prn+MPpnD]	34,80	
7	[Prn+Iva] [SJD] [MppnE] [Pnb+MTie+ATie+APpn+Rib] [Grd] [Pxe] [MPpnD]	52,24	
8	[Prn+MPpnD+Iva] [Pnb] [Appn] [Grd] [Pxe] [MTie+ATie+Rib] [SJD] [MPpnE]	42,37	
9	[Atie+Rib] [Pnb] [Grd] [SJD] [Prn+MPpnD+Iva] [Appn] [Mtie] [Pxe] [MPpnE]	39,08	
10	[Prn+Iva] [Pxe] [Grd] [SJD] [MTie] [Atie+Rib] [MppnD] [Pnb] [MppnE] [APpn]	45,50	
11	[Prn] [Pxe] [Grd] [SJD] [MTie] [Atie+APpn] [MppnD] [Pnb] [MppnE] [Iva] [Rib]	58,59	

# Rede haplotípica

A rede de haplótipos construída a partir de 162 sequências para doze localidades e 48 haplótipos de *Hypostomus ancistroides* é retratada na figura 9. A tabela 12 mostra a correspondência entre os nomes dos haplótipos nas árvores filogenéticas e na rede haplotípica.

Alguns aspectos importantes são prontamente notados. i) Os haplótipos de maior frequência (H2, H3, H8 e H11) ocupam uma posição central em relação a uma série de outros haplótipos de menor frequência e apenas um ou dois passos mutacionais de diferença. ii) Esses mesmo haplótipos de maior frequência não apresentam distribuição restrita, ocorrendo em duas (H8), três (H11) e quatro (H2 e H3) localidades. iii) Existe diversos haplótipos de baixa frequência, exclusivos a apenas uma localidade. iv) Existe um grande número de passos separando os diferentes haplótipos.

Essas observações iniciais revelam uma complexa estrutura populacional, moldada há um tempo considerável para espécie. A alta diversidade haplotípica juntamente com o elevado número de passos mutacionais que separam alguns haplótipos, sugerem um tempo de diversificação das sub-populações relativamente avançado para a espécie. As distâncias genéticas média e máxima registradas para as populações (dist Pméd=1.5%; Pmáx=2.9%) corroboram a idéia de um longo tempo de diversificação haplotípica. Entretanto, os diferentes haplótipos apresentam claramente diferentes histórias evolutivas. Existe um padrão onde diversos haplótipos presentes em uma mesma localidade estão separados por um grande número de passos mutacionais. Esse número varia entre 15 para os haplótipos H3 e H25 do rio Grande (Grd), e 34 para os haplótipos H8 e H9 do rio Paranapanema (MPpnD). Essa configuração reflete os resultados encontrados para análises filogenéticas e de distância genética. Este cenário sugere duas hipóteses: i) o desaparecimento de haplótipos intermediários, por ação da amostragem de linhagem (lineage sorting); ii) contato secundário entre linhagens. No primeiro caso, devido a aleatoriedade inerente a deriva gênica, espera-se encontrar haplótipos intermediários, mesmo que em baixa frequência. Para alguns casos, um baixo número amostral pode resultar em haplótipos intermediários não amostrados. Esse pode ser o caso de populações com como MTie, Iva, APpn, Pxe e SJD. Mesmo assim, a rede haplotípica mostra que esse padrão se repete para todas as localidades amplamente amostradas, como os rios Paranaíba (Pnb), Tietê (MTie), Grande (Grd) e Paranapanema (MPpnE e MPpnD), e também para o rio Ivaí (Iva). Portanto, a segunda hipótese referindo-se ao contato secundário é a mais aceitável nesse caso.

As quatro estruturas radiais, centralizadas pelos haplótipos de maior frequência (H2, H3, H8 e H11), são habitualmente atribuídas à expansões demográficas ou geográficas. Considerando que a probabilidade de mutações acontecerem em um mesmo nucleotídeo é extremamente baixa, eventos de expansão geram um número crescente de haplótipos raros com estreita relação com o haplótipo do qual derivaram (geralmente ancestral), resultando em um padrão "estrelado" na rede haplotípica (Beebee & Rowe 2008). Essas quatro estruturas radiais revelam uma diversificação haplotípica relativamente recente, com apenas um ou dois passos mutacionais de diferença para o haplótipo central. Os haplótipos H2 e H3, devido à sua ampla distribuição e alta frequência de ocorrência, são considerados haplótipos ancestrais (Freeland 2005). As estruturas centralizadas por H2 e H3 apresentam um alcance geográfico considerável em relação a área de distribuição da espécie. A primeira abrange os rios Paranaíba, Grande, Tietê e Ribeira de Iguape. É importante notar que as 20 sequências relativas ao Ribeira de Iguape são constituídas por esse haplótipo. Tal fato sugere um contato recente entre essa bacia costeira e as cabeceiras próximas de rios do Alto Paraná. O cenário mais provável é o de um contato com a bacia do alto rio Tietê, devido a maior proximidade geográfica. Esse contato seria responsável pela colonização e estabelecimento de uma subpopulação na bacia do Ribeira, restrita à sua porção norte. A estrutura centralizada por H3 abrange localidades nos rios Paranaíba, Grande, médio e alto Tietê e alto Paranapanema. A estrutura centralizada por H8 em especial distribui-se por uma área restrita do médio ao baixo rio Paranapanema, alcançando o rio Paraná (Prn, MPpnD e MPpnE). A estrutura centralizada por H11 abrange os rios Grande, Tietê e do Peixe (Grd, ATie e Pxe). Isso mostra que *H. ancistroides* pode ter um alcance consideravelmente longo durante eventos de expansão geográfica.



Figura 10: Rede haplotípica de parcimônia representando 48 haplótipos de *H. ancistroides*. Legendas: cores a direita representando as doze localidades amostradas; número de indivíduos para cada haplótipo a esquerda. Alguns círculos contém o número de indivíduos para facilitar a visualização.

Hanc_Tie01	H1	Hanc_Pnb01	H17	Hanc_Grd23	H33
Hanc_Tie02	H2	Hanc_Pnb06	H18	Hanc_Ppn47	H34
Hanc_Tie04	H3	Hanc_Pnb09	H19	Hanc_Ppn48	H35
Hanc_Tie05	H4	Hanc_Grd06	H20	Hanc_Ppn49	H36
Hanc_Tie06	H5	Hanc_Grd07	H21	Hanc_Ppn50	H37
Hanc_Ppn01	H6	Hanc_Ppn38	H22	Hanc_Iva01	H38
Hanc_Ppn02	H7	Hanc_Ppn39	H23	Hanc_Iva03	H39
Hanc_Ppn03	H8	Hanc_Grd13	H24	Hanc_Prn01	H40
Hanc_Ppn04	H9	Hanc_Grd14	H25	Hanc_Prn03	H41
Hanc_Ppn08	H10	Hanc_Ppn40	H26	Hanc_Prn04	H42
Hanc_Ppn09	H11	Hanc_Grd17	H27	Hanc_Tie28	H43
Hanc_Ppn11	H12	Hanc_Tie26	H28	Hanc_Tie29	H44
Hanc_Ppn12	H13	Hanc_Ppn42	H29	Hanc_Tie31	H45
Hanc_Ppn14	H14	Hanc_Grd18	H30	Hanc_Prn06	H46
Hanc_Ppn17	H15	Hanc_Grd20	H31	Hanc_Grd29	H47
Hanc_Ppn25	H16	Hanc_Grd22	H32	Hanc_Pnb14	H48

Tabela 12: Relação dos haplótipos usados nas análises filogenéticas e seus códigos correspondentes usados na rede haplotípica.

#### Análise dos clados hierarquizados (NCPA)

Um total de dezessete clados apresentou variação geográfica e foram portanto analizados pelo programa GEODIS. Desse total, apenas cinco apresentaram índices significativos de associação entre as distâncias genética e geográfica. Os resultados das análises para as duas distâncias (em linha e por água) e as interpretações dos possíveis eventos naturais relacionados a esses clados, estão na tabela 13. Os clados hierarquizados estão na figura 10.

Tabela 13: Resultados das análises dos clados hierarquizados (NCPA) que apresentaram índices significativos de associação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas, com as respectivas interpretações.

Clado 1-38			distância	em linha	distância por água	
H/C	І/Т	locs.	Dc	Dn	Dc	Dn
H44	Т	MTie	0,0000	255,8442	0,0000	469,4805
H2	I	Pnb, Grd, ATie, Rib	201,5942	211,0417	625,1553	600,1063L*
H28	Т	ATie	0,0000	142,3750	0,0000	355,0000
H43	Т	MTie	0,0000	246,2500	0,0000	451,8750
I-T			201,5942	-24,2919	625,1553L*	152,6401
		1-2-11-17 - resultado inconclusivo		1-2-3-4- <i>NO</i> - fluxo gênico restrito com isolamento por distância		

Clado 3-8			distância	em linha	distância por água	
H/C	ι/т	locs.	Dc	Dn	Dc	Dn
2-13	I	MPpnE	0,0000	379,7468	0,0000	1023,7342
2-16	I	Pnb, Grd, MTie, ATie, Appn	188,1501	205,0627	793,8338L*	708,3118L*
2-17	Т	Pnb, Grd, MTie, ATie, Rib	229,5270	224,0897	599,4932	627,0319
I-T			-46,3282	-14,4300	173,4502	89,5805
		1-2-11-17 inconc	- resultado lusivo	1-2-3-4- <i>NO</i> - restrito com por dis	fluxo gênico isolamento stância	

Clado 4-1			distância	em linha	distância por água		
H/C	ГЛ	locs.	Dc	Dn	Dc	Dn	
3-1	Т	Iva	0,0000	345,4762	0,0000	758,9286	
3-2	Т	Pnb, MPpnD	324,0000	295,8125	690,0000	825,0000L*	
3-3	Т	Pnb, SJD, Prn	277,8378	280,5446	508,7838	617,7599	
3-4	Т	Grd, ATie, Pxe, Prn	151,8935S*	226,9375S*	459,1716 S*	639,7500	
3-5	I	Grd	0,0000	349,6386	0,0000	768,0723	
I-T			-212,4887	93,2960	-505,1125	94,6326	
† "quan 2) para resoluç discrimin coloniza restritos para d geográfi entre m distância	tidade c a dete ão ger nar ent ação ou a - proce letermin ica é s noviment a".	le clados é insuficiente (≤ rminar concordância - nética insuficiente para re expansão geográfica/ u dispersão/fluxo gênico eder ao passo 7 da chave nar se a amostragem uficiente para discriminar tação de curta ou longa	1-2-3-4- <i>NO</i> - fluxo gênico restrito com isolamento por distância		1-2-3-5-6- <b>†</b> -7- <i>YES</i> - dispersão/fluxo gênico restritos, mas com alguma dispersão de longa distância		

Clado 4-2			distância em linha		distância por água	
H/C	νт	locs.	Dc	Dn	Dc	Dn
3-6	I	MPpnE, Iva	72,0000	348,9660	520,0000	848,7252
3-7	т	Grd, Prn, MPpnE, MPpnD	70,3184S*	295,7912	178,8325S*	791,1692L*
3-8	I	Pnb, Grd, MTie, ATie, MPpnE, APpn, Rib	224,6335S*	278,9518	692,2393S*	797,3710 L*
I-T			148,7983L*	-14,3088	507,1812L*	8,0580
† "quantidade de clados é insuficiente (≤ 2) para determinar concordância - resolução genética insuficiente para discriminar entre expansão geográfica/colonização ou dispersão/fluxo gênico restritos - proceder ao passo 7 da chave para determinar se a amostragem geográfica é suficiente para discriminar entre movimentação de curta ou longa distância".			1-2-3-4- <i>NO</i> - fluxo gênico restrito com isolamento por distância		1-2-3-5-6- <b>†</b> -7- <i>YES</i> - dispersão/fluxo gênico restritos, mas com alguma dispersão de longa distância	

Cladograma total			distância em linha		distância por água	
H/C	I/T	locs.	Dc	Dn	Dc	Dn
4-1	Т	Pnb, Grd, SJD, ATie, Pxe, Prn, MPpnD, Iva	254,1863	262,0574	670,5590S*	751,3490
4-2	Т	Pnb, Grd, MTie, ATie,Prn, MPpnE, MppnD, Appn, Iva, Rib	287,4235	280,9273	801,3785	794,3941L*
I-T			inexistente			
		1-2 - resultado inconclusivo		1-2 - resultado inconclusivo		



Figura 11: Rede haplotípica de parcimônia representando clados hierarquizados para análise NCPA de 48 haplótipos de *H. ancistroides*.

A análise encontrou resultados não significativos na maior parte dos casos, indicando que a hipótese nula de que não há associação geográfica entre haplótipos não pode ser rejeitada. Ainda, para aqueles clados com valores de  $D_c$  e  $D_n$  estatisticamente significativos, o resultado da chave de inferência foi inconclusivo uma parcela considerável dos casos. Para as análises de distância em linha, três dos cinco resultados foram inconclusivos, enquanto que nas análises de distância por água, duas resultaram inconclusivas. Tais resultados podem ser decorrentes de uma amostragem incompleta para se tomar conclusões sobre a história natural das populações.

O clado 1-38 apresentou resultado inconclusivo para as análises de distância em linha, e indicou fluxo gênico restrito com isolamento por distância para distância por água. Este último resultado não parece concordar com a estrutura característica de expansão populacional ou geográfica encontrada na rede haplotípica. Este clado apresenta um haplótipo central de características ancestrais (H2) conectado radialmente a haplótipos de baixa frequência, presentes na mesma localidade ou em localidades próximas àquelas onde encontra-se H2. Não há portanto evidência para se acreditar em fluxo gênico restrito ou algum tipo de isolamento por distância. Tal resultado deve ser um artefato da estratégia usada para medir as distâncias por água entre localidades. Isto é, caso tenha havido um contato ou captura entre cabeceiras que permitiu a expansão geográfica neste clado, a análise de NCPA utilizando distância por água atribuirá a diferença entre os haplótipos à essa longa distância. Neste caso, o cenário mais plausível, de acordo com a rede haplotípica, é de contatos diretos entre cabeceiras das bacias envolvidas.

O clado 3-8 retornou resultado inconclusivo para as análises de distância em linha, e indicou fluxo gênico restrito com isolamento por distância para distância por água. Este clado inclui os clados 1-37 e 1-38. Aparentemente, 1-37 representa a mesma história demográfica

do clado 1-38. Da mesma forma que para o clado 1-38, a sua estrutura radial na rede de haplótipos contesta o resultado obtido pela análise de distância por água. Portanto, pressupõese a ocorrência de eventos de expansão, provavelmente por contato ou captura de cabeceiras.

Os clados 4-1 e 4-2 representam os eventos mais antigos de separação entre as linhagens de *H. ancistroides*. As análises desses clados retornaram os mesmos resultados. Para o cálculo de distância em linha, o resultado para os dois clados aponta fluxo gênico restrito com isolamento por distância. Para o cálculo de distância por água, o resultado aponta dispersão/fluxo gênico restritos, com alguma dispersão por longa distância. Ambos os clados analisados abrangem grande parte da área de distribuição da espécie. De uma forma geral, os resultados para as duas formas de cálculo de distância indicam uma estruturação populacional baseada na distribuição geográfica em tempos mais remotos para a espécie. Considerando que as conexões da rede haplotípica refletem a coalescência dos haplótipos, os clados de maior nível hierárquico devem retornar informações mais antigas em relação à estruturação populacional. Assim, estes resultados concordam com as topologias encontradas nas análises filogenéticas, que sugerem uma estruturação de isolamento, resultando na formação dos diferentes filogrupos. Para o clado 4-1, que abrange os filogrupos 1, 2 e 3, um cenário de dispersão por longas distâncias explica a ampla área de distribuição da espécie. Considerando que esses três filogrupos estão em alopatria, é natural considerar que distância seja um impedimento para a dispersão. Isso a princípio pode parecer contraditório, pois pressupõe uma dispersão por longas distâncias, seguida de um isolamento por essas mesmas distâncias já percorridas durante o processo de colonização das bacias hidrográficas. Entretanto, deve-se considerar a hipótese de que esses eventos de dispersão/colonização e de isolamento devem ter ocorridos em momentos históricos diferentes. Ou seja, diferentes épocas podem ter facilitado ou dificultado a dispersão das linhagens.

Para o clado 4-2, representando o filogrupo 4, argumentos semelhantes podem ser evocados. Entretanto, ele não representa a formação de diferentes filogrupos, como o clado 4-1. De acordo com os resultados filogenéticos, este filogrupo apresenta linhagens mais inclusivas de distribuição em bacias mais ao sul, e uma linhagem mais derivada distribuída em bacias da porção mais ao norte do Alto Paraná. Essa topologia provavelmente resulta de momentos históricos diferentes que isolaram uma linhagem na porção mais baixa do Alto Paraná e posteriormente permitiram sua dispersão em direção as porções mais altas.

Entre os dois clados do nível quatro analisados existe uma questão importante sobre a forma de dispersão. Possivelmente, os eventos de dispersão e isolamento entre populações desses diferentes clados não ocorreram durante os mesmos períodos. Para o clado 4-1 houve primeiramente uma dispersão por toda a área do Alto Paraná, seguida de um aparente isolamento regional. Alguns eventos subsequentes de dispersão podem ser hipotetizados com base nas análises filogenéticas, como, por exemplo, a linhagem pertencente ao filogrupo 1 que está presente na localidade MPpnD (figura 7). Para o clado 4-2, as linhagens mais basais aparentemente não se dispersão de uma primeiro momento. Elas estiveram restritas aos rios na porção sul do Alto Paraná. A dispersão de uma de suas linhagens ocorre posteriormente em direção à montante do rio Paraná

Um aspecto interessante sobre os resultados da NCPA é que, aparentemente, as duas formas de inferir as distância entre populações podem ser aplicadas com resultados coerentes para clados em que diferentes eventos naturais estão envolvidos na estruturação populacional. Isto é, as distâncias mais curtas entre duas localidades (em linha reta) retornam informações mais coerentes em situações de fluxo gênico através de contatos esporádicos entre rios (como mudanças de curso ou capturas de cabeceiras), ao passo que as distâncias calculadas por água são mais informativas para dispersão por longas distâncias através dos cursos principais dos rios. A estrutura da rede de haplótipos em si sugere expansão geográfica para os clados 1-37 e 1-38, com fluxo gênico entre as localidades por ele ocupadas, como mostra o clado 3-8. Entretanto, estes clados comportam haplótipos de quase todas as localidades amostradas neste trabalho, independente da distância geográfica entre elas ou da forma pela qual ela foi aferida. Isso é um indício de que não havia barreiras para dispersão, sejam elas geográficas ou relativas a distância. A hipótese mais plausível para esse cenário é de que esses movimentos de dispersão possam ter acontecido por contato direto entre cabeceiras e braços de rios de diferentes bacias. É possível que, em algum momento mais recente da história da espécie, esse tipo de contato entre rios e subsequente dispersão tenha sido facilitado por razões naturais. O padrão de dispersão encontrado nesses clados se repete nos clados 1-17 e 1-30, reforçando essa hipótese. Neste caso, é natural que análises de associação entre distribuição e frequência de haplótipos retornem resultados mais coerentes quando as distâncias são calculadas em linha reta. Por outro lado, quando as circunstâncias históricas não favorecem contatos entre rios de diferentes bacias, a única via de dispersão é dada pelos leitos principais dos rios. Sendo assim, neste caso o cálculo de distância por água entre localidades devem resultar em hipóteses mais coerentes sobre a distribuição dos haplótipos.

## Dinâmica demográfica de Hypostomus ancistroides

Os resultados desse trabalho apontam para *H. ancistroides* como uma espécie de ampla distribuição, com linhagens genealógicas bem definidas e algum grau de sobreposição em suas áreas de distribuição. Não é possível estabelecer um padrão claro de distribuição devido a ampla distribuição de linhagens. Dois cenários principais podem ser evocados para explicar essa ampla distribuição: i) *H. ancistroides* apresenta uma ampla distribuição, sem estruturação populacional, e a ocorrência de haplótipos é determinada simplesmente por "separação de

73

linhagens" (lineage sorting); ii) H. ancistroides apresenta uma história de sucessivos isolamentos geográficos seguidos de expansão populacional/geográfica, moldando um complexo padrão filogeográfico. A primeira hipótese representa uma visão simplificada de um cenário demográfico. Unicamente o fato de não se poder distinguir um padrão de distribuição conta ao seu favor. Por outro lado, os resultados deste trabalho apresentam uma série de evidências de que a segunda hipótese seria um cenário mais realístico para a história demográfica da espécie. A presença de linhagens de filogrupos com profundidade filogenética relativamente alta e com poucos haplótipos intermediários, a relação entre as distâncias genéticas médias dos filogrupos e dos haplótipos de cada filogrupo, os índices de diversidade h e  $\pi$  indicando longa história evolutiva e/ou contato secundário, e valores altos de F<sub>ST</sub> indicando estruturação populacional também alta e baixo fluxo gênico entre as populações estabelecidas, e alguns dos resultados de NCPA, são indicativos de um histórico de isolamento de populações. A esse histórico, soma-se evidências de contatos entre algumas populações, evidenciados pelo teste de neutralidade de Tajima, pela distribuição de haplótipos, pela rede haplotípica, pelos padrões filogeográficos dos quatro filogrupos, e pelas análises de variância molecular (AMOVA e SAMOVA). Isso concorda com a idéia difundida, porém nunca testada em grande escala, de que espécies de Hypostomus apresentam baixa capacidade de dispersão. Por outro lado, ao longo da história demográfica de H. ancistroides, diversos eventos de expansão geográfica e colonização puderam ser identificados. Isso mostra que, apesar de sua baixa capacidade de dispersão, eventos históricos particulares permitiram que linhagens se dispersassem e diferenciassem. Como resultado, a estrutura populacional de H. ancistroides nos mostra a espécie ocupando grandes extensões de uma região hidrográfica, e contatos secundários entre suas diferentes linhagens. Aparentemente, a estrutura hidrográfica do Alto Paraná não sofreu mudanças significativas em sua atual fisionomia desde

o final do Mioceno ou início do Quaternário. Exceto pela mudança de curso de cabeceiras do rio Paraná há cerca de 9.0 Ma, que deixam de correr em direção a atual bacia amazônica e passam a desaguar no rio Paraná (Albert & Reis 2011), nenhuma outra modificação substancial é relatada. A diferenciação da espécie H. ancistroides ocorre justamente nesse período (Montoya Burgos 2003). Admitindo-se que as populações da espécie tendem a ser estruturadas, e que nenhuma mudança drástica na paisagem hidrográfica está envolvida em movimentos de dispersão ou expansão geográfica, pode-se propor que mudanças climáticas tenham exercido alguma influência na dispersão dos haplótipos. Variação na temperatura e umidade de uma região têm implicação direta não só na vegetação, como também no volume de água em bacias de drenagens. Dessa forma, flutuações nos níveis dos rios acarretam em mudanças que podem interferir na dispersão de peixes de duas formas: i) através de mudanças em microhabitat, e ii) aumentando a probabilidade de contato entre tributários de diferentes bacias em épocas de maior umidade. Essas duas hipóteses teriam implicação direta nas formas de dispersão testada neste trabalho para H. ancistroides: por dentro dos rios principais, ou através de contatos entre cabeceiras e tributários. Variações climáticas são bem relatadas para Quaternário e em especial para o Holoceno na região onde se encontra a bacia do Alto Paraná. Durante o Alto Plioceno, há cerca de 2.8 a 2.6 Ma, houve uma retração latitudinal da faixa tropical (Albert & Reis 2011).

A possibilidade da existência de mais de uma espécie no complexo *H. ancistroides* é ainda uma questão nebulosa, que obviamente envolve toda a problemática sobre conceitos de espécie conhecida por vasta literatura (e.g. de Queiroz 1998; Pinna 1999; Mallet 2006). As diferentes linhagens que se formaram, identificadas como diferentes filogrupos, são potenciais espécies relacionadas entre si. A ausência de linhagens intermediárias e a divergência genética que existe entre elas atendem a alguns conceitos de espécie existentes. Por exemplo, conceitos

envolvendo a formação de linhagens filogenéticas, como o Conceito Evolutivo (Evolutionary Species Concept [CE], Simpson [1951], Wiley [1978, 1981]) e o Conceito Geral de Linhagem (General Lineage Concept of Species [CGL], de Queiroz [1998]). No primeiro caso, CE admite que linhagens com papel evolutivo e tendências próprias constituem unidades evolutivas fundamentais a serem chamadas de espécies. Segundo de Queiroz (1998), conceitos de espécie obedecem a uma idéia única e central de linhagens evolutivas em um nível populacional, referido pelo autor como "conceito geral de espécie", porém com diferenças conceituais entre eles. Essa perspectiva originou o CGL, que se propõe a abranger apenas o elemento comum aos principais critérios de determinação de espécies. Por outro lado, conceitos de espécie baseados na monofiletismo de linhagens não implicam em ruptura de fluxo gênico nos casos de filogenias baseadas em marcadores mitocondriais, cuja herança é matrilineal. Neste caso, o uso de marcadores moleculares codominantes é fundamental para se inferir ruptura de fluxo gênico entre as linhagens. Assim, os resultados desse trabalho não atendem ao Conceito Biológico de Espécie (Biological Species Concept [CBE], Mayr 1963, Dobzhansky 1970). Em contrapartida, o padrão filogeográfico de H. ancistroides, com áreas de simpatria entre linhagens, representa o cenário ideal para se testar hipóteses de ruptura de fluxo gênico. Diferentes linhagens em distribuição alopátrica certamente não apresentam fluxo gênico. Entretanto, isso não indica que esse fluxo não possa acontecer caso elas entrem em contato novamente. Isto é, a ruptura no fluxo gênico pode ser resultado de uma condição circunstancial de alopatria. Portanto, para H. ancistroides, a inferência de fluxo gênico em áreas de contato entre linhagens é a forma mais adequada de se confirmar a existência de processos de especiação baseado no CBE em trabalhos futuros.

Independentemente de decisões taxonômicas, *H. ancistroides* é um taxon que apresenta um ampla variação morfológica em suas populações. Em peixes neotropicais, existe

de uma forma geral, uma correspondência entre diferenciação morfológica e distribuição alopátrica. Considerando que as linhagens representadas pelos quatro filogrupos revelam períodos de isolamento geográfico para algumas populações, é possível que a variação morfológica da espécie resulte dessa segregação. A plasticidade reconhecida em peixes capturados em diversas regiões seria portanto decorrente do contato secundário entre essas populações. O conceito de plasticidade fenotípica se refere a variação morfológica atribuída a fatores extrínsicos durante a ontogenia (Gilbert & Epel 2009), e portanto não seria o termo adequado a ser utilizado. Neste caso, a estruturação populacional seria a causa dessa variação, independente do fato de haver cruzamento entre indivíduos de diferentes linhagens.

Os resultados deste trabalho abrem novas perspectivas para estudos futuros em *H. ancistroides*, assim como para outras espécies do gênero. O uso de marcadores moleculares codominantes para corroborar as relações filogenéticas da espécie e inferir introgressão gênica entre as diferentes linhagens é talvez a etapa mais importante a ser desenvolvida. Além disso, estudos morfológicos detalhados poderão testar a hipótese de associação da plasticidade à estrutura populacional, e atribuir diferentes morfotipos a diferentes bacias ou linhagens.

#### Conclusões

Este trabalho apresenta uma discussão sobre a evolução de uma espécie, abordando aspectos filogenéticos e filogeográficos, inferidos a partir de sequências de DNA mitocondrial. Foram elaboradas perguntas sobre a história demográfica de *H. ancistroides*, a fim de se inferir padrões filogeográficos, processos naturais relacionados a especiação, e discutir hipóteses sobre a variação morfológica na espécie. Essas perguntas são respondidas de forma direta nesta seção do trabalho, na forma de objetivos específicos.

1. Testar as hipóteses de monofiletismo para as populações de *Hypostomus ancistroides* e de que o taxon é um complexo de espécies.

Os resultados filogenéticos mostraram que os espécimes identificados como *H. ancistroides* constituem um grupo monofilético. O total de amostras pertencentes ao gênero *Hypostomus* utilizadas neste trabalho, sendo a maior parte delas pertencentes a bacia do Alto Paraná e outras bacias próximas, não deixa praticamente nenhuma possibilidade de que este taxon não seja composto por linhagens de um único e exclusivo ancestral. A hipótese de que *H. ancistroides* constitua um complexo de espécies foi abordada, mas não resolvida de forma conclusiva. Apesar dos resultados atenderem a alguns conceitos de espécies, este trabalho assume uma postura conservadora quanto a esse ponto. Baseado no CBE, a total ruptura de fluxo gênico entre as diferentes linhagens correspondendo a potenciais espécies não pode ser comprovada, uma vez que existe algumas áreas de sobreposição entre essas linhagens, e o marcador utilizado apresenta herança matrilineal. A inferência de fluxo gênico em áreas de

contato entre diferentes linhagens será utilizada em trabalhos futuros para se confirmar a existência de processos de especiação, baseados no CBE.

2. Descrever a estruturação populacional e a história demográfica de *H. ancistroides*.

A espécie possui uma ampla distribuição no Alto Paraná, sendo encontrada nos principais rios dessa bacia hidrográfica com área de drenagem abrangendo cerca de 900.000 km<sup>2</sup>, além de ser registrada na bacia costeira do rio Ribeira de Iguape. A estruturação populacional mostrouse extremamente complexa, originada a partir de quatro linhagens, que apresentam sinais de expansão geográfica ao longo de suas histórias demográficas, resultando em contatos secundários e um padrão filogeográfico de considerável simpatria entre elas. Não foram identificados padrões de estruturação por bacias ou por proximidade geográfica. A presença da espécie no rio Ribeira de Iguape é explicada por um evento de captura de cabeceiras do rio Tietê por parte dessa bacia costeira, sendo essa hipótese sustentada por dados em literatura para outras espécies de peixes.

3. Inferir o fluxo gênico e capacidade de dispersão entre diferentes populações de *H*. ancistroides e testar a hipótese de que diferentes rios da bacia do Alto Paraná representem áreas de endemismo independentes para a espécie.

As populações apresentam forte estruturação, e o fluxo gênico entre elas parece estar restrito a alguns períodos de sua história demográfica, e associados a eventos naturais como variações climáticas e mudanças em cursos de rios, principalmente de cabeceiras. Resultados sobre a distribuição de haplótipos sugerem que as expansões geográficas podem ter um alcance

considerável entre as principais bacias do Alto Paraná, exemplificados pelos clados 1.17, 1.37 e 1.38 na figura 10.

 Discutir as possíveis causas de variação morfológica inter- e intraespecífica do gênero Hypostomus em relação à estrutura populacional.

A estruturação populacional, caracterizada por diferentes linhagens com histórias filogeográficas próprias, é hipotetizada como causa da variação morfológica em *H. ancistroides*. Um período de isolamento por alopatria entre essas linhagens teria permitido o acúmulo de algumas diferenças morfológicas. O contato secundário entre as linhagens resultaria em uma maior amplitude de variação fenotípica nas regiões onde ele ocorre. Essa amplitude de variação, fato comum para várias espécies do gênero *Hypostomus*, é fonte de incerteza em resoluções taxonômicas, levando muitos autores a considerarem a hipótese de que *H. ancistroides* é constituído por mais de uma espécie. Estudos associando os padrões de variação morfológica à estrutura populacional poderá confirmar essa hipótese.

## **Referências Bibliograficas**

Abell, R., M. L. Thieme, C. Revenga, M. Bryer, M. Kottelat, N. Bogutskaya, B. Coad, N. Mandrak, S. C. Balderas, W. Bussing, M. Stiassny, P. Skelton, G. R. Allen, P. Unmack, A. Naseka, R. Ng, N. Sindorf, J. Robertson, E. Armijo, J. V. Higgins, T. J. Heibel, E. Wikramanayake, D. Olson, H. L. López, R. E. Reis, J. G. Lundberg, M. H. S. Pérez & P. Petry. 2008. Freshwater ecoregions of the world: A new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. Bioscience, 58:403–414.

Anderson, E. C. & E. A. Thompson. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. Genetics, 160:1217-1229.

Akaike, H. 1973. Information Theory and an Extension of the Maxi- mum Likelihood Principle. In: Petrov, B. N & F. Csaki, eds. Second International Symposium on Information Theory. Budapest: Akademiai Kiado, pp. 267–281.

Albert J. A. & T. P. Carvalho. 2011. Neogene Assembly of Modern Faunas. In: Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. Albert, J. S, Reis, R. E. (eds) 21-58. University of California Press.

Albert, J. A. & Reis, R. E. 2011. Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. University of California Press. 368 p.

Albert J. A., P. Petry & Reis, R. E. 2011. Major Biogeographic and Phylogenetic Patterns. In: Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. Albert, J. S, Reis, R. E. (eds) 21-58. University of California Press.

Aljanabi S. M. & I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, 25(22): 4692-4693.

Alves A. L., C. Oliveira, M. Nirchio, Á. Granado & F. Foresti. 2006. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. Genetica, 128:1-9.

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 and Evolution, 12:298–318.

Armbruster, J. W. 1997. Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Ancistrinae, Hypostominae, and Neoplecostominae. Tese de Doutorado, University of Illinois, Urbana-Champaign.

Armbruster, J. W. 2003. The species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae). Zootaxa, Magnolia Press 249: 1-60.

Armbruster, J. W., 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and Ancistrinae. Zoological Journal of the Linnean Society, 141: 1-80.

Armbruster, J. W. & L. S. de Souza. 2005. *Hypostomus macushi*, a new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from Guyana. Zootaxa 920: 1–12.

Armbruster, J. W., L. A. Tansey & N. K. Lujan. 2007. *Hypostomus rhantos* (Siluriformes: Loricariidae), a new species from southern Venezuela. Zootaxa 1553: 59–68.

Artoni R. F. & L. A. C. Bertollo. 1996. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. Caryologia 49: 81-90.

Avise J. C., J. Arnold, R. M. Ball Jr, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb & N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst., 18: 489-522.

Avise J. C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press. 447 p.

Avise J. C. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. New York, Chapman and Hall. 684 p.

Beebee T. J. C. & G. Rowe. 2008. An Introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press, Inc. 400 p.

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

Birindelli, J. L. O., A. M. Zanata, & F. C. T. Lima. 2007. *Hypostomus chrysostiktos*, a new species of armored catfish (Siluriformes, Loricariidae) from rio Paraguaçu, Bahia State, Brazil. Neotropical Ichthyology 5(3): 271–278.

Boeseman, M. 1968. The genus *Hypostomus* Lacépède, 1803, and its Surinam representatives (Siluriformes : Loricariidae). Zoologische Verhandelingen, Rijksmuseum van Naturlijke Historie te Leiden 99: 1-89.

Boeseman, M. 1969. Additional new species of *Hypostomus* Lacépède, 1803, from Surinam, with remarks on the apparent "*gymnorhynchus*-complex" (Siluriformes: Loricariidae). Beaufortia 215(16): 119-136.

Brea, M., A. F. Zucol. 2011. The Paraná-Paraguay Basin: Geological and Paleoenviromental.In: Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. Albert, J. S, Reis, R. E. (eds)69-87. University of California Press.

Brito, P. M., F. J. Meunier, & M. E. C. Leal. 2007. Origine et diversification de l'ichthyofaune Neotropical: Une revue. Cybium, 31:139–153.

Britski, H.A. & F. Langeani. 1988. *Pimelodus paranaensis*, sp.n., um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, 5(3):409-417.

Buckup, P. A. 2011. The Eastern Brazilian Shield. In: Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. Albert, J. S, Reis, R. E. (eds). 203-210. University of California Press.

Bueno V., C. H. Zawadzki & V. P. Margarido. 2011. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. Rev. Fish Biol. Fisheries, no prelo.

Burnham, K. P. & D. R. Anderson. 2003. Model selection and multi- model inference. a practical information-theoretic approach. New York: Springer.

Casatti, L., F. C. Rocha & D. C. Pereira. (2005). Habitat use by two species of *Hypostomus* (pisces, loricariidae) in southeastern brazilian streams. Biota Neotropica, 5(2): 1-9.

Castro, R.M.C. & L. Casatti. 1997. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River Basin, south- eastern Brazil. Ichthyol. Explor. Freshwaters 7:337-352.

Chouard, T. 2010. Revenge of the hopeful monster. Nature, 463(18): 864-867.

Cione, A. L., M. M. Azpelicueta, J. R. Casciotta & M. T. Dozo. 2005. Tropical freshwater teleosts from Miocene beds of eastern Patagonia, southern Argentina. Geobios, 38:29-42.

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

Cracracft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. Curr. Ornithol, 1:159-187.

Cracracft, J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative speceis concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: Speciation and its consequences. Otte, D. & Endler, J. A. (eds). Sunderland, Mass. Sinauer, 28-59p.

Crandall K. A. & A. R. Templeton .1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. Genetics, 134, 959-969.

Delarbre, C. & G. Gachelin. 1997. A unique cDNA coding for subunits 8 and 6 of mitochondrial adenosine triphosphatase of the lancelet *Branchiostoma lanceolatum*, an ancestor of vertebrates. Biochem. Gen., 35:181-187.

de Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. Pages 57–75 *in* Endless forms: Species and speciation (D. J. Howard, and S. H. Berlocher, eds.). Oxford University Press, New York.

Di Dario, F. 2010. Sistemática e Ictiologia: histórias, espécies e maquinistas. Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia, n.100.

Dobzhansky, T. 1970. Genetics of the evolutionary process. Columbia University Press, New York.

Dupanloup, I., S. Schneider & Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. Molecular Ecology, 11(12):2571-81.

Endo K. S. 2006. Análise citogenética de espécies da subfamília Hypostominae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do Alto Rio Paraná. Dissertação de Mestrado. UEM, Maringá. 47 p.

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

Excoffier, L., G. Laval & S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1:47-50.

Excoffier, L. & H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, 10:564-567.

Faulks, L. K., D. M. Gilligan & L. B. Beheregaray. 2008. Phylogeography of a threatened freshwater fish (*Mogurnda adspersa*) in eastern Australia: conservation implications. Marine and Freshwater Research, 59:89–96.

Ferraris, C. J., Jr. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. Zootaxa 1418: 1-628.

Fisher, R. A. 1930. The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford.

Freeland J. R. 2005. Molecular Ecology. John Wiley & Sons, Ltd. 388 p.

Froufe, E., S. I. Alekseyev, I. Knizhin & S. Weiss. 2005. Comparative mtDNA sequence (control region, ATPase 6 and NADH-1) divergence in *Hucho taimen* (Pallas) across four Siberian river basins. Journal of Fish Biology, 67:1040–1053.

Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, 146:915-925.

Géry, J. 1969. The fresh-water fishes of South America. In Biogeography and ecology in South America. E. J. Fittkau et al. (eds). Junk, The Hague, p. 828-848.

Gilbert, S. F. & D. Epel. 2009. Ecological Deelopmental Biology: Integrating Epigenetics, Medicine and Evolution. Sinauer Associates Inc. 480p.

Grant W. S. & B. W. Bowen. 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.

Harrison R. G. 1998. Linking evolutionary pattern and process: the relevance of species concepts for the study of speciation, pp. 19-31. In *Endless Forms: Species and Speciation*, (Eds. Howard, D.J and S.H. Berlocher), Oxford University Press, NY and Oxford.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Hollanda Carvalho, P. & Weber, C. 2004. Five new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from middle and lower Amazon System. Revue suisse de Zoologie, Muséum d'histoire naturelle de Genève 111(4): 953-978.

Hollanda Carvalho, P., Lima, F. C. T. & Zawadzki, C. H. 2010. Two new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Negro basin in Brazil. Neotropical Ichthyology, 8(1):39-48.

Holsinger K. E. & B. S. Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F<sub>ST</sub>. Nature Review-Genetics, 10: 639-650.

Hubert H. & Renno, J-F. 2006. Historical Biogeography of South American Freshwater fishes. Journal of Biogeography. 33:1414-1436.

Ihering, R. von. 1911. Algumas especies novas de peixes d'agua doce (Nematognatha) (*Corydoras, Plecostomus, Hemipsilichthys*). Revista do Museo São Paulo v. 8 (1910): 380-404.

Jablonka E. & M. J. Lamb. 2006. Evolution in four dimensions: genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life. MIT Press. 462 p.

Jerep, F. C., O. A. Shibatta & C. H. Zawadzki. 2007. A new species of Hypostomus Lacepede, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Parana basin, southern Brazil. Neotropical Ichthyology 5(4): 435-442.

Kotlík, P. N. G. Bogutskaya & F. G. Ekmekçi. 2004. Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. Molecular Ecology, 13:87–95.

Lanave, C., G. Preparata, C. Saccone, & G. Serio. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. J. Mol. Evol, 20:86–93.

Langeani, F., R. M. C Castro, O. T. Oyakawa, O. A. Shibatta, C. S. Pavanelli, & L. Casatti. 2007. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. Biota Neotropica v.7(3):181-197.

Le Bail P.-Y., P Keith & P. Planquette. 2000. *Atlas des poissons d'eau douce de Guyane, tome 2, fasc. 2.* Collection Patrimoines Naturels, 43(II), MNHN/SPN, Paris. 307 p.

Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.

Lilyestrom H. G. 1984. Consideraciones sobre la taxonomia del género *Cochliodon* Heckel en Venezuela (Pisces, Loricariidae). Revista UNNELLEZ de Ciencia y Technologia, 2, 41-53.

Lucinda, P. H. F. 2008. Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the description of twenty-one new species. Neotropical Ichthyology, 6(2):113-158.

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, Colombia, edited by R. F. Kay, R. H. Hadden, R. L. Cifelli, and J. J. Flynn, 67–91. Washington, DC: Smithsonian Press.

Lundberg, J. G. 1998. The temporal context for diversification of Neo- tropical fishes. In Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes, L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, C. A. S. Lucena, and Z. M. S. Lucena (eds), 67–91. Porto Alegre: Edipucrs.

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

Malabarba, M. C. & J. G. Lundberg. 2007. A fossil loricariid catfish (Siluriformes: Loricarioidea) from the Taubaté Basin, eastern Brazil. Neotropical Ichthyology 7(3): 263–270.

Maldonado-Ocampo J. A., F. A. Villa-Navarro, A. Ortega-Lara, S. Prada-Pedreros, U. J. Villa, A. Claro, J. S. Usma, T. S. R. Lara, W. C. Salazar, J. F. C. Barrios & J. E. García-Melo. 2006. Peces del río Atrato, zona hidrogeográfica del caribe, Colombia. Biota Colombiana. 7(1). 143-154.

Mallet, J. 2006. Species concepts. In: Evolutionary Genetics: Concepts and Case Studies. Fox C.W. & J. B. Wolf (eds). Oxford University Press, Oxford, 367-373p.

Martinez E. R. M. 2009. Estudo da evolução do gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) com base em caractéres cromossômicos e sequências de DNA. Tese de Doutorado, UNESP-Botucatu. 113 p.

Mayr E. 1963. Animal species and evolution. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Mazzoni, R., U. Caramaschi & C. Weber. 1994. Taxonomical revision of the species of *Hypostomus* Lacédède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) from the Lower rio Paraiba do Sul, State of Rio de Janeiro, Brazil. Revue Suisse de Zoologie, 101(1):3-18.

Meirmans P. G. & P. W. Hedrick. 2011. Assessing population structure:  $F_{ST}$  and related measures. Molecular Ecology Resources, 11: 5-18.

Michelle J.L., C. S. Takahashi & I. Ferrari. 1977. Karyotypic studies of some species of the family Loricariidae (Pisces). Cytologia 42: 539-546.

Milhomem S. S. R., R. R. Castro, C. Y. Nagamachi, A. C. P. Souza, E. Feldberg & J. C. Pieczarka. 2010. Different cytotypes in fishes of the genus Hypostomus Lcépède, 1803,

(Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). Comparative Cytogenetics, 4(1): 45-54.

Montoya-Burgos, J. I., S. Muller, C. Weber, C. & J. Pawlowski. 1998. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes): based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: Malabarba, L. R., Reis, R. E. Vari, R. P. Lucena, Z. M. S. & Lucena, C. A. S. (eds.) Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, 363-374.

Montoya-Burgos J. I., C. Weber & P-Y. Le Bail. 2002. Phylogenetic relationships within *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and related genera based on mitochondrial D-loop sequences. Revue suisse de Zoologie, Muséum d'histoire naturelle de Genève 109(2): 369-382.

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

Moore, G.W., M. Goodman & J. Barnabas. 1973. An iterative approach from the standpoint of the additive hypothesis to the dendrogram problem posed by molecular data sets. J. Theor. Biol, 38:423–457.

Nelson, G. & N. Platnick. 1981. Systematics and Biogeography, cladistics and vicariance. Columbia University Press. New York. 567 p.

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. American Naturalist, 106: 283-292.

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 23: 341-369.

Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.

Oyakawa, O. T., Akama, A. & Zanata, A. M. 2005. Review of the genus *Hypostomus* Lacepède, 1803 from Ribeira do Iguape basin, with description of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Zootaxa 921: 1-27.

Paiva S., E. Renesto & C. H. Zawadzki. 2005. Genetic variability of *Hypostomus* (Teleostei, Loricariidae) from the Ribeirão Maringá, a stream of the upper Rio Paraná basin, Brazil. Genetics and Molecular Biology, 28(3): 370-375.

Panchal, M., & M. A. Beaumont. 2007. The automation and evaluation of the nested clade phylogeographic analysis. Evolution, 61:1466-1480.

Peichel, C. L., K. S. Nereng, K. A. Ohgi, B. L. E. Cole, P. F. Colosimo, C. A. Buerkle, D. Schluter & D. M. Kingsley. 2001. The genetic architecture of divergence between threespine stickleback species. Nature, 414.

Perdices, A., E. Bermingham, A. Montilla & I. Doadriob. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. Molecular Phylogenetics and Evolution 25: 172–189.

Petit, R. J. 2008. On the falsifiability of the nested clade phylogeographic analysis method. Molecular Ecology, 17(6):1404.

Phillimore A. B., I. P. Owens, R. A. Black, J. Chittock, T. Burke & S. M. Clegg. 2008. Complex patterns of genetic and phenotypic divergence in an island bird and the consequences for delimiting conservation units. Molecular Ecology, 17(12): 2839-2853.

Pinna, M. C. C. 1999. Species concepts and phylogenetics. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 9: 353-373.

Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and Evolution, 25:1253-1256.

Posada, D. & T. R. Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. Syst Biol. 53:793–808.

Posada, D., K. A. Crandall & A. R. Templeton. 2000. GEODIS: A program for the Cladistic Nested Analysis of the Geographical Distribution of Genetic Haplotypes. Molecular Ecology, 9(4):487-488.

Potter, P. E. 1997. The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: A natural history. Journal of South American Earth Sciences 10:331–344.

Pritchard, J. K., M. Stephens & P. Donnelly. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. Genetics, 155: 945-959.

Ramos-Onsins, S. E. & J. Rozas. 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. Mol. Biol. Evo, 19(12): 2092–2100.

Reeves, R. G., and E. Bermingham. 2006. Colonization, population expansion, and lineage turnover: Phylogeography of Mesoamerican characiform fish. Biological Journal of the Linnean Society, 88:235–255.

Reeves, P. A. & C. M. Richards. 2011. Species Delimitation under the General Lineage Concept: An Empirical Example Using Wild North American Hops (Cannabaceae: *Humulus lupulus*). Systematic Biology, 60(1):45-59.

Reis, R. E., C. Weber & L. R. Malabarba. 1990. Review of the genus *Hypostomus* Lacepéde, 1803 from southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces: Siluriformes: Loricariidae). Revue Suisse de Zoologie, 97(3):729-766.

Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris-Jr. 2003. Checklist of the freshwater fishes of Central and South America. (eds.) EDIPUCRS. 729 p.
Renesto E., C. H. Zawadzki & S. Paiva. 2007. Allozyme differentiation and relationships within *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the upper Paraguay River basin, Brazil. Biochemical Systematics and Ecology, 35: 869-876.

Ribeiro, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the fresh- water fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: An example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. Neotropical Ichthyology 4:225–246.

Ribeiro, A. C., F. C. T. Lima, C. Riccomini & N. A. Menezes. 2006. Fishes of the Atlantic Rainforest of Boracéia: testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. Ichthyol. Explor. Freshwaters, 17 (2):157-164.

Robinson, D.F. 1971. Comparison of labeled trees with valency three. J Combinator. Theory Series B, 11:105–119.

Rubert M., C. H. Zawadzki & L. Giuliano-Caetano. 2008. Cytogenetic characterization of Hypostomus nigromaculatus (Siluriformes: Loricariidae). Neotropical Ichthyology, 6(1): 93-100.

Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4:406–425.

Sanger F, S. Nicklen & A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 (12): 5463–5467.

Simpson G. G. 1951. The species concept. Evolution, 5: 285-298.

Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics, 139, 457–462.

Sofia S. H., B. A. Galindo, F. M. Paula, L. M. K. Sodré & C. B. R. Martinez. 2008. Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. Genetics and Molecular Biology, 31(1): 317-323.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics, 123:585–595.

Takako, A. K., C. Oliveira & O. T. Oyakawa. 2005. Revision of the genus *Pseudotocinclus* (Siluriformes: Loricariidae: Hypoptopomatinae), with descriptions of two new species. Neotropical Ichthyology, 3(4):499-508.

Tamura, K. & M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 10:512-526.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution (no prelo).

Templeton A. R., K. A. Crandall & C. F. Sing. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132, 619-633.

Templeton, A. R. 1994. The role of molecular genetics in speciation studies. In: Molecular Approaches to Ecology and Evolution. B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner & R. DeSalle (eds). Basel, Birkhäuser Verlag. 455-477 p.

Templeton, A. R. 2004. Inference key for the nested haplotype tree analyses of geographical distances. Disponível em: <u>http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html</u> (versão 06 de janeiro de 2011)

Templeton, A. R. 2008. Nested clade analysis: an extensively validated method for Strong phylogeographic inference. Molecular Ecology, 17: 1877-1880

Templeton, A. R., E. Routman & C. A. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of 177 mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, Ambystona tigrinum. Genetics, 140: 767-782.

Torres R. A. & J. Ribeiro. 2009. The remarkable species complex *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Glandulocaudinae) from the Southern Atlantic Rain forest (Brazil) as revealed by molecular systematic and population genetic analyses. *Hydrobiologia*, 617, 157-170.

Triponez Y., S. Buerki, M. Borer, R. E. Naisbit, M. Rahier, & N. Alvarez. 2011. Discordances between phylogenetic and morphological patterns in alpine leaf beetles attest to an intricate biogeographic history of lineages in postglacial Europe. Molecular Ecology, 20(10).

Vari, R.P. 1988. The Curimatidae, a lowland neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. In Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns W. R. Heyer & P. E Vanzolini (eds). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 343-377.

Waples, R. S. & O. Gaggiotti. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene poos and their degree of connectivity. Molecular Ecology. 15: 1419-1439.

Weber, C. 1985. *Hypostomus dlouhyi* nouvelle espèce de poisson-chat cuirassé du paraguay (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Revue Suisse de Zoologie, 92(4): 955- 968.

Weber, C. 2003. Subfamily Hypostominae. In: Checklist of the freshwater fishes of Central and South America. Reis, R. E., Kullander, S. O. Ferraris-Jr, C. J. (eds.) Porto Alegre: EDIPUCRS. 351-372.

Wiley E. O. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. Syst. Zool., 27: 17-26.

Wiley E. O. 1981. Phylogenetics. New York, Wiley.

Won Y-J, A. Sivasundar, Y. Wang & J. Hey. 2005. Systematics and the Origin of Species: On the origin of Lake Malawi cichlid species: A population genetic analysis of divergence. PNAS. 102 (1): 6581–6586.

Won Y-J, Y. Wang, A. Sivasundar, J. Raincrow & J. Hey Mol. 2006. Nuclear Gene Variation and Molecular Dating of the Cichlid Species Flock of Lake Malawi. Biol. Evol. 23(4):828–837.

Wright, A. 1931. Evolution in Mendelian populations. Genetics, 16:97-159.

Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations* vol. 4, *Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago, IL. 590 p.

Zawadzki C. H., E. Renesto, S. Paiva & M. C. S. Lara-Kamei. 2004. Allozyme differentiation of four populations of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from Ribeirão Keller, a small stream in the upper Rio Paraná basin, Brazil. Genetica, 121: 252-257.

Zawadzki C. H., E. Renesto, R. E. Reis, M. O. Moura & R. P. Mateus. 2005. Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. Genetica, 123: 271-283.

Zawadzki, C. H., J. L. O. Birindelli & F. C. T. Lima. 2008. A new pale-spotted species of Hypostomus Lacépède (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Tocantins and Xingu basins in central Brazil. Neotropical Ichthyology, 6(3): 395-402.

Zawadzki C. H., C. Weber & C. S. Pavanelli. 2010. A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. Neotropical Ichthyology, 8(4): 719-725.

## Anexos

## Anexo I

Informações relativas as amostras de *H. ancistroides* utilizadas nesse trabalho.

Sequência	Haplótipo	localidade	Instituição, número do lote, e localidade de coleta
Hanc_Pnb01	H17		MZUSP 100864 Córrego de nome desconhecido,
Hanc_Pnb02	H17		tributário do rio do Bagre. Bacia do rio Paranaíba. Mazargão. MG. 17º 58' 38'' S / 48º 38' 17'' W
Hanc_Pnb03	H3		
Hanc_Pnb04	H3		
Hanc_Pnb05	H3		
Hanc_Pnb06	H18		
Hanc_Pnb07	H3	Dob	MZUSP 100865 Rio São Bento. Bacia do rio Paranaíba.
Hanc_Pnb08	H3	PHD	Santo Antonio do Rio Verde. GO. 17º 56' 24'' S / 47º 29'
Hanc_Pnb09	H19		08'' W
Hanc_Pnb10	H2		
Hanc_Pnb11	H2		
Hanc_Pnb12	H3		
Hanc_Pnb13	H2		
- Hanc_Pnb14	H48		35903 - UNESP 7291 Córrego Fazenda Bálsamo. Bacia do rio Paranaíba. Corumbaíba. GO. 17o 48' 05.1'' S / 48o 22' 19.3'' W
Hanc_Grd01	H11		
Hanc_Grd02	H11		MZUSP 100867 Rio Mogi Guaçu, Bairro da Ziza. Bacia do
Hanc_Grd03	H11		rio Grande. Inconfidentes. MG. Sem coordenadas
Hanc_Grd04	H11		
Hanc_Grd05	H11		
Hanc_Grd06	H20		Dibaixão do Dântono, no confluâncio do vio Mari Cusou
Hanc_Grd07	H21		Ribeirao do Pantano, na confluencia do río Mogi Guaçu.
Hanc_Grd08	H11		Bacia do no Grande, allo no Parana. Descaivado. SP. 21
Hanc_Grd09	H11		56 00 5/47 34 00 W
Hanc_Grd10	H11		
Hanc_Grd11	H11		Ribeirão do Pântano, na confluência do rio Mogi Guaçu.
Hanc_Grd12	H21		Bacia do rio Grande, alto rio Paraná. Descalvado. SP. 21° 56' 00'' S / 47° 34' 00'' W
Hanc_Grd13	H24		18623, 186245, 18625, 18626 – UNESP 2888 Córrego
Hanc_Grd14	H25		Mocoquinha, bacia do rio Cubatão. Bacia do rio Grande. Cajuru. SP. 21o 19' 37.1'' S / 47o 14' 19.6'' W 19535 - UNESP 2950 Córrego da Batata, Bacia do rio
Hanc_Grd15	H11		Grande. Colômbia. SP. 20o 14' 10.2'' S / 48o 40' 42.0'' W
Hanc_Grd16	H3	Grd	25929 - UNESP 5011 Córrego Agua Boa, bacia do rio Mogi Guaçu. Bacia do rio Grande. Araras. SP. 22o 22' 07'' S / 47o 28' 38'' W
Hanc_Grd17	H27		25908 – UNESP 5002 Córrego do Batata. Bacia do rio Grande. Colômbia. SP. 20o 14' 10'' S / 48o 40' 42'' W
Hanc_Grd18	H30		25932 – UNESP 5013 Córrego Água Boa, bacia do rio Mogi Guaçu, estrada Rio claro-Araras. Bacia do rio Grande. Araras. SP. 220 22' 07'' S / 470 28' 38'' W
Hanc_Grd19	H3		
Hanc_Grd20	H31		23333, 23334, 23333, 23330, 23337 - UNESP 3014 Córrago Água Roa bacia do rio Mogi Cuasu ostrado Bio
Hanc_Grd21	H3		corrego Agua doa, dacia do rio Mogi Guaçu, estrada Kio claro-Araras, Bacia do rio Crando, Araras, SP, 220, 22'
Hanc_Grd22	H32		$10^{-1}$ Alalas. Bacia uo 110 Uldilue. Alalas. Sr. 220 22 07" S / 470 28' 38" W
Hanc_Grd23	H33		07 5/ 7/020 30 W

Llama Crd24	112		27000 27011 27012 27012 UNESD 5020 Dia 580
Hanc_Grd24 Hanc_Grd25	H2		Domingos. Bacia do rio Grande. Muzambinho. MG. 210
	112		19 59.9 5/400 27 24.9 W
Hanc_Grd26	H2		28028, 28029, 28030 - UNESP 5887 RIO São Domingos.
Hanc_Grd27	H2		Bacia do rio Grande. Muzambinno. MG. 210 18' 08.5''
Hanc_Grd28	H2		S /460 28' 33.9'' W
Hanc_Grd29	H47		18623, 186245, 18625, 18626 – UNESP 2888 Córrego
Hanc_Grd30	H47		Mocoquinha, bacia do rio Cubatão. Bacia do rio Grande. Cajuru. SP. 21o 19' 37.1'' S / 47o 14' 19.6'' W
Hanc_Grd31	H2		27909, 27911, 27912, 27913 - UNESP 5920 Rio São
Hanc_Grd32	H2		Domingos. Bacia do rio Grande. Muzambinho. MG. 21o 19' 59.9'' S /46o 27' 24.9'' W
Hanc_Prn07	H46		17365, 17366, 17367, 17368, 17369 - UNESP 2600
Hanc Prn08	H46		Córrego sem nome na bacia do rio São José dos
Hanc Prn09	H46	SJD	Dourados. Bacia do rio Paraná. Sebastianópolis. SP. 200
Hanc Prn11	H46		44' 43.7'' S / 49o 46' 45.3'' W
Hanc Tie28	H43		
Hanc Tio20			20050 20051 20050 20052 20054 LINESD 6768
Hanc_Tie29			52230, 52231, 52232, 52235, 52234 - UNESP 0700 Dibairão Cubatão Dacia da ria Tiatâ Maranaama SD
Hanc_Tie30	H44		Ribeirao Cubatao. Bacia do rio Tiete. Marapoama. SP.
Hanc_Tie31	H45	MTie	210 11' 35'' S / 490 07' 22'' W
Hanc_Tie32	H44	WITIC	
Hanc_Tie33	H44		32288 - UNESP 6781 Ribeirão Cubatão. Bacia do rio Tietê. Marapoama. SP. 21o 10' 36.3'' S / 49o 10' 21.0'' W
Hanc Tie01	H1		
Hanc Tie02	H2		Itaquaxiara, cidade Itapecerica da Serra, Bacia do
Hanc Tio02			Guarapiranga, Alto rio Tietê
Hanc_Tie03			
Hanc_Tie04	H3		
Hanc_Tie05	H4		Tie 08 007 - 033 rio Passa Cinco, sob a ponte na SP
Hanc_Tie06	H5		191, a cerca de 1 km da entrada de Ipeúna, município de
Hanc_Tie07	H3		lpeúna, SP. 22o 25.845' S / 47o 41.786' W
Hanc_Tie08	H3		
Hanc Tie09	H2		Itaguaxiara, cidade Itapecerica da Serra, Bacia do
Hanc Tie10	H1		Guarapiranga, Alto rio Tietê, 23°40'50,29"S
- Hanc_Tie11	H2		46°45'25.70"O
Hanc Tie12	H3		25964, 25965, 25966, 25967 – UNESP 5025 Rio Passa-
Hanc Tie13	H3		Cinco. Bacia do rio Tietê. Rio Claro. SP. 220 21' 51'' S /
Hanc Tie14	H3		47o 30' 49'' W
- Hanc_Tie15	H3		18720, 18721, 18722,18723 - UNESP 2897 Córrego Jacutinga. Bacia do rio Tietê. Bofete. SP. 230 09' S / 480 16' W
Hanc_Tie16	H3	ATie	20393, 20394 – UNESP 3400 Rio Capivara. Bacia do rio Tietê. Botucatu. SP. 22o 52' 20.9'' S / 48o 22' 27.3'' W
Hanc_Tie17	H3		18720, 18721, 18722,18723 – UNESP 2897 Córrego
Hanc Tie18	H3		Jacutinga. Bacia do rio Tietê. Bofete. SP. 230 09' S / 480
Hanc Tie19	H3		16' W
Hanc Tie20	НЗ		20434 20435 - LINESP 3388 Rio Canlvarinha Bacia do
Hanc_Tie21	H3		rio Tietê. Botucatu. SP. 220 52' 08.6'' S / 480 22' 03.4'' W
Hanc Tie22	НЗ		20432 20433 - LINESP 3387 Rio Canlvarinha Racia do
	.15		rio Tietê Botucatu SP 220 52' 08 6'' S / 480 22' 03 4''
Hanc_Tie23	H3		W 20393 20394 - LINESE 3400 Pio Contygen Pacia do rio
Hanc_Tie24	H3		Tietê. Botucatu. SP. 220 52' 20.9'' S / 480 22' 27.3'' W
Hanc_Tie25	H2		25883, 25885 - UNESP 4992 Rio Paraitinguinha. Bacia

Hanc_Tie26	H28		do rio Tietê. Salesópolis. SP. 23o 30' 40.3'' S / 45o 51' 32.6'' W
Hanc_Tie27	H3		25964, 25965, 25966, 25967 - UNESP 5025 Rio Passa- Cinco. Bacia do rio Tietê. Rio Claro. SP. 220 21' 51'' S / 470 30' 49'' W
Hanc_Ppn09	H11		Ppn08 285, 286, 287, 293 - 102835 Ribeirão da Laje,
Hanc_Ppn10	H11	Dvo	divisa dos municípios Santo Anastácio e Ribeirão dos
Hanc_Ppn11	H12	TXC	Índios. Bacia do rio Paranapanema. Santo Anastácio. SP. 21º 52' 00'' S / 51º 37' 23'' W
Hanc_Prn01	H40		31753 - UNESP 6714 Rio Paraná. Bacia do rio Paraná. Marilena. PR. 22o 39' 01.2'' S / 53o 05' 29.9 W
Hanc_Prn02	H11		31947, 31948 - UNESP 6619 Córrego Três Lagoas. Bacia
Hanc_Prn03	H41		do rio Paraná. Marilena. PR. 22o 37' 57.3'' S / 53o 03' 09.4'' W
Hanc_Prn04	H42		31965, 31966 - UNESP 6633 Rio Água da Marilena.
Hanc_Prn05	H42		Bacia do rio Paraná. Marilena. PR. 220 38' 52.4'' S / 530 04' 43.0'' W
Hanc_Prn06	H46	Prn	17301 - UNESP 2634 Rio Baia. Bacia do rio Paraná. Porto Rico. PR. 22o 43' 03.2'' S / 53o 17' 27.6'' W
Hanc_Ppn08	H10		Ppn08 115, 116, 117 - 100918 Represa. Bacia do rio Paranapanema. Teodoro Sampaio. SP. 22° 30' 53'' S / 52° 08' 41'' W
Hanc_Ppn39	H23		Teodoro Sampaio. Bacia do rio Paranapanema. SP. 220 30' 53" S - 520 08' 41" W
Hanc_Ppn40	H26		Ppn08 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127,128 –100903 Morro do Diabo, sob ponte na rodovia SP 613. Bacia do rio Paranapanema. Teodoro Sampaio. SP. 22° 30' 38'' S / 52° 21' 46'' W
Hanc_Ppn12	H13		
Hanc_Ppn13	H8		
Hanc_Ppn14	H14		
Hanc_Ppn15	H8		
Hanc_Ppn16	H8		
Hanc_Ppn17	H15		
Hanc_Ppn18	H8		
Hanc_Ppn19	H14		MZUSP100861 (8616) Ribeirão Maringá, afluente do rio
Hanc_Ppn20	H14		Pirapo. Bacia do Alto Parana. Maringa. PR. 23° 22' 28'
Hanc_Ppn21	H8		S / 51° 58° 09° W
Hanc_Ppn22	HI3		
Hanc Pph23	п14 uo		
Hanc Ppn25	П0 Ц16		
Hanc Pon26	нто H17		
Hanc Don 27	H8		
Hanc Pnn28	H8		
Hanc Pnn20	H8		MZUSP 100863 (8262) Córrego de nome desconhecido
Hanc_Ppn30	H8	MPpnE	afluente do rio Interventor, divisa de Santa Fé. Bacia do Paranapanema. Munhoz de Melo. PR. 23° 10' 17'' S / 51° 46' 25'' W
Hanc Ppn31	H8		MZUSP 100866 Córrego Mandacaru, bacia do rio
Hanc_Ppn32	H14		Paranapanema. Bacia do rio Paranapanema. Maringá. PR.
Hanc_Ppn33	H8		23o 23' 00'' S / 51o 56' 30'' W (coord. estimada)
Hanc_Ppn34	H8		MZUSP 100868 Ribeirão próximo a Marialva. Bacia do rio
Hanc_Ppn35	H8		Paranapanema. Marialva. PR. 23° 26' 34'' S / 51° 46'
Hanc_Ppn36	H8		11'' W

Hanc_Ppn41	Н8		MZUSP 100863 (8262) Córrego de nome desconhec afluente do rio Interventor, divisa de Santa Fé. Bacia Paranapanema. Munhoz de Melo. PR. 23° 10' 17'' 51° 46' 25'' W		
Hanc_Ppn46	H8		29734 – UNESP 6380 Ribeirão Cambézinho. Bacia do rio Paranapanema. Londrina. PR. 23o 29' 01.0'' S / 51o 04' 40.7'' W		
Hanc Ppn47	H34		29758, 29759, 29760 - UNESP 6387 Afluente do rio		
Hanc Ppn48	H35		Taguara. Bacia do rio Paranapanema. Califórnia. PR.		
Hanc Ppn49	H36		23°40'54.90" S / 51°18'54.78" W		
Hanc_Ppn50	H37		29902 – UNESP 6399 Afluente do rio Taquara. Bacia do rio Paranapanema. Califórnia. PR. 23°39'23.16" S / 51°14'33.72'' W		
Hanc_Ppn01	H6		Ppn08 067 - MZUSP 100905 Riacho em meio a canavial, próximo a rodovia SP- 333. Bacia do rio Paranapanema. Assis. SP. 22° 38' 51'' S / 50o 29' 51'' W		
Hanc_Ppn02	H7				
Hanc_Ppn03	H8				
Hanc_Ppn04	H9	MPpnD			
Hanc_Ppn05	H6	•	MZUSP 102826 Ribeirao do Cervo na cidade de Maracai.		
Hanc_Ppn06	H8		Bacia do rio Paranapanema. Maracai. SP. 22° 36' 01'' S /		
Hanc_Ppn07	H9		50° 40 31 W		
Hanc_Ppn37	H8				
Hanc_Ppn38	H22				
Hanc_Ppn42	H29		22480 22401 22402 UNESD 2882 Die Neve Basia de		
Hanc_Ppn43	H3	ADon	22409, 22491, 22492 - UNESP 5002 RIU NOVO. Bacia UU		
Hanc_Ppn44	H3	АРрп	10 Paranapanema. Avare. SP. 230 01 27.4 5 / 480 49		
Hanc_Ppn45	H3		41.0 W		
Hanc_lva01	H38		29937, 29938, 29939 – UNESP 6411 Rio Mourão. Bacia		
Hanc_Iva02	H38	Iva	do rio Ivaí. Campo Mourão. PR. 24°04'24.60" S /		
Hanc_Iva03	H39		52°17'28.02" W		
Hanc_Rib01	H2		220 48' 00" S / 460 EE' 00" W		
Hanc_Rib02	H2		230 48 00 3/460 35 00 W		
Hanc_Rib03	H2		Rib07 099, 100 - 99668 Pesqueiro Triângulo. Bacia do rio Ribeira de Iguape. Iporanga. SP. 230 48' 00'' S / 460 55' 00'' W		
Hanc_Rib04	H2				
Hanc_Rib05	H2				
Hanc_Rib06	H2				
Hanc_Rib07	H2				
Hanc_Rib08	H2				
Hanc_Rib09	H2	Rih			
Hanc_Rib10	H2	<b>ND</b>			
Hanc_Rib11	H2		Bacia do rio Pibeira de Iguane, 230 48' 00'' S. / 460 55'		
Hanc_Rib12	H2		00" W		
Hanc_Rib13	H2				
Hanc_Rib14	H2				
Hanc_Rib15	H2				
Hanc_Rib16	H2				
Hanc_Rib17	H2				
Hanc_Rib18	H2				
Hanc_Rib19	H2				
Hanc_Rib20	H2				

## Anexo II

Informações relativas as demais amostras utilizadas neste trabalho.

identificação	no. de tombo	no. da amostra	localidade
H. aff. piratatu	UNESP 2156	15155,15157-15159	Rio Paraguai. Bacia do rio Paraguai. Porto Jofre. MS. Sem coordenadas
H. boulengeri	MZUSP não tombado	1-2	procedência de aquariofilia
H. cf. boulengeri	UNESP 27394	5635	Riacho urbano próximo a rua Padre Antônio Vieira, bairro Santa Cruz, bacia do rio Coxipó, bacia do rio Cuiabá. Bacia do rio Paraguai. Cuiabá. MT. 15º 36' 20.1" S / 56º 03' 06.9" W
H. affinis	MZUSP não tombado	1-2	Ribeirão Bonito, córrego que passa no Clube de Pesca 3 Vales. Bacia do rio Paraíba do Sul. São Jose do Vale do Rio Preto. RJ. 22º 13' 20.7" S / 43º 00' 51.7" W
H. commersoni	MCP 22767		Lajeado do Tomás, na estrada entre Cruz Alta e Ibirubá. Bacia do rio Jacui. RS. 28° 38' 25" S / 54° 55' 00" W
H. commersoni	MCP 26678		Rio Ibicuí, próximo a ponte da estrada Uruguaiana/Itaqui (BR 472). Bacia do rio Uruguay. RS 29° 24' 00" S / 56° 42' 00" W
H. tapijara	MZUSP 99649	Rib07 065	Tanque de criação em fazenda sem nome. Bacia do rio Ribeira de Iguape. Barra do Turvo. SP. 24o 47' 04" S / 48o 31' 44" W

identificação	no. de tombo	no. da amostra	localidade
H. tapijara	MZUSP 99666	Rib07 097	Rio Ribeira de Iguape, próximo a Iporanga. Bacia do rio Ribeira de Iguape. Iporanga. SP. 24o 35' 00" S / 48o 35' 00" W
H. interruptus	MZUSP 99631	Rib07 029, 030, 031	Rio a beira da estrada de terra, cerca de 50 metros abaixo de uma cachoeira. Bacia do rio Ribeira de Iguape. Pedro de Toledo. SP. 24o 14' 06" S / 47o 13' 43" W
H. cf. rondoni	MZUSP 96813	6160, 6179	Cachoeira da Neblina, num tributário do rio Peixoto de Azevedo, afluente do rio Teles Pires. Bacia do rio Tapajós. Peixoto de Azevedo. MT. 10o 23' 10" S / 54o 18' 22" W
H. cf. rondoni	MZUSP não tombado	PIPE09 013	Cachoeira da Neblina, num tributário do rio Peixoto de Azevedo, afluente do rio Teles Pires. Bacia do rio Tapajós. Peixoto de Azevedo. MT.
H. plecostomoides	UNESP 2197	15503	Laguna de Castilleiros, lagoa marginal do rio Orinoco na Estação de Aquicultura da Universidad de Oriente. Bacia do rio Orinoco. Caicara del Orinoco. Venezuela
H. gr. cochliodon spn	MZUSP não tombado	Jari09	Rio Jari, AP
H. gr. cochliodon	MZUSP não tombado	PIPE09 004, 007-010	Tributário do rio Peixoto de Azevedo, imediatamente a montante da Cachoeira da Neblina. Bacia do rio Tapajós. Peixoto de Azevedo. MT. 10° 23' 33" S / 54° 18' 09" W
H. gr. cochliodon	MZUSP não tombado	6164	Serra do Cachimbo, PA

identificação	no. de tombo	no. da amostra	localidade
H. gr. cochliodon	MZUSP 96816	6165	Cachoeira da Neblina, num tributário do rio Peixoto de Azevedo, afluente do rio Teles Pires. Bacia do rio Tapajós. Peixoto de Azevedo. MT. 10° 23' 10" S / 54° 18' 22" W
H. gr. cochliodon	MZUSP não tombado	Т90	rio Tapirapé, PA
H. ericae	UNESP 2424	16214	Fundo, bacia do rio Araguaia. Bacia do rio Tocantins. Barra do Garça. MT. 15º 52' 40.4" S / 52º 18' 15.5" W
H. gr. cochliodon	MZUSP 97253	7170	Rio Jamanxim, próximo a vila de Castelo dos Sonhos (cerca de 30 km). Bacia do rio Tapajós. Novo Progresso. PA. 08º 11' 04" S / 55º 21' 28" W
H. gr. cochliodon	MZUSP 97358	7191, 7194	Rio Jamanxim, próximo à Vila Mil. Bacia do rio Tapajós. Novo Progresso. PA. 07°43' 51" S / 55°16'35" W
H. gr. cochliodon	MZUSP 97507	7241	Rio Jamanxim, na prainha, próximo a Novo Progresso. Bacia do rio Tapajós. Novo Progresso. PA. 07º 03' 52" S / 55º 26' 28" W
H. gr. cochliodon	MZUSP 97154	7287	Rio Curuá, bacia do rio Iriri, na vila de Castelo dos Sonhos. Bacia do rio Xingu. Altamira. PA. 08o 19' 07" S / 55o 05' 23" W

identificação	no. de tombo	no. da amostra	localidade
H. gr. cochliodon	UNESP 5634	27393	Riacho urbano próximo a rua Padre Antônio Vieira, bairro Santa Cruz, bacia do rio Coxipó, bacia do rio Cuiabá. Bacia do rio Paraguai. Cuiabá. MT. 15º 36' 20.1" S / 56º 03' 06.9" W
H. gr. cochliodon	MZUSP 97576	TP07 058, 059	Rio Matrinchã, afluente do rio Teles Pires. Bacia do rio Tapajós. Itaúba. MT. 10o 51' 09" S / 55o 13' 44" W
H. gr. cochliodon	MZUSP 99376	TP08 013	Rio Teles Pires, a jusante da desembocadura do rio Renato. Bacia do rio Tapajós. Itaúba. MT. 11o 03' 44" S / 55o 19' 08" W
H. gr. cochliodon	MNRJ 1289		
H. gr. cochliodon	MNRJ 1825		
H. sp.	UNESP 5537	27210-27213	Rio Balsas. Bacia do rio Parnaíba. Balsas. MA. 07º 32' 26'' S / 46º 02' 21'' W
H. sp.	MZUSP 100862		Rio Guarda Mor, afluente do rio das Velhas. Bacia do rio São Francisco. Guarda Mor. MG. 17º 46' 18'' S / 47º 05' 43'' W
H. cf. wuchereri	MZUSP 102938	BA08 006, 007	Rio Gongogi, abaixo da confluência com o rio Novo, na fazenda Amaralina. Bacia do rio de Contas. BA. 14o 26' 06'' S / 39o 49' 54'' W

identificação	no. de tombo	no. da amostra	localidade
H. cf. rondoni	MZUSP 96568	TP07 026	Córrego na beira da BR 163, perto da cidade de Itaúba, afluente do rio Teles Pires. Bacia do rio Tapajós. Itaúba. MT. 11o 06' 10'' S / 55o 18' 00'' W
H. cf. rondoni	MZUSP 97652	TP07 083	Rio Teles Pires. Bacia do rio Tapajós. Itaúba. MT. 10o 58' 30" S / 55o 44' 03" W
H. johnii	MZUSP não tombado	HJ01-03	
H. strigaticeps	UNESP 2148	10667	Rio Araquá. Bacia do rio Tietê. Botucatu. SP. 22° 44,830' S / 48° 28,495' W
H. latirostris	UNESP 7536	35612, 35613	Rio Cuiabá. Bacia do rio Paraguai. Cuiabá. MT. 15° 39' 09.9" S / 56° 04' 08.6" W
H.mutucae	UNESP 7538	35350-35353	Rio Claro, bacia do rio Cuiabá. Bacia do rio Paraguai. Chapada dos Guimarães. MT. 15º 20' 13" S / 55º 53' 45" W
H. agna	MZUSP 99667	Rib07 083, 084	Rio Ribeira de Iguape, próximo a Iporanga. Bacia do rio Ribeira de Iguape. Iporanga. SP. 24o 35' 00" S / 48o 35' 00" W
H. agna	MZUSP 99667	Rib07 098	Provavelmente rio Ribeira de Iguape. Bacia do rio Ribeira de Iguape. Iporanga. SP. 24o 35' 00" S / 48o 35' 00" W
H. luetkeni	UNESP 6442	29082, 29083, 29085, 29086	Rio Paraíba do Sul. Bacia do rio Paraíba do Sul. Guararema. SP. 23º 22' 26.2" S / 46º 03' 10.6" W

identificação	no. de tombo	no. da amostra	localidade
H. goyazensis	UNESP 4952	UNESP 13579, 13581	Rio Vermelho, bacia do rio Araguaia. Bacia do rio Tocantins. Goiás. GO. 15º 54' 10.9" S / 50º 06' 53.8" W
H. aff. tapanahoniensis	MZUSP não tombado	JA08 025	Rio Jari, AP
Hypostomus sp.	MZUSP 97509	7231, 7240	Rio Jamanxim, na Prainha, próximo a Novo Progresso. Bacia do rio Tapajós. Novo Progresso. PA. 07o 03' 52" S / 55o 26' 28" W
Hypostomus sp.	MZUSP 97362	7199	Rio Jamanxim, próximo a vila Mil. Bacia do rio Tapajós. Novo Progresso. PA. 07o 43' 51" S / 55o 16' 36" W
H. faveolus	MZUSP 98109		Rio Couto Magalhães, perto da vila de São José do rio do Couto. Bacia do rio Xingu. Campinópolis. MT. 13º 50' 17" S / 53º 03' 53" W
Hypostomus sp.	MZUSP não tombado	T15, T19	rio Tapirapé, PA
Hypostomus sp.	MZUSP não tombado	M1-M5	rio Verde, afluente do rio Grande.
Hypostomus sp.	MZUSP não tombado	M6, M7	rio Verde, afluente do rio Grande.
Hypostomus spp.	MZUSP não tombado	Grd09 031, 032, 036, 047, 048, 051, 052, 054, 059, 060, 073, 078, 095, 096, 142, 152	Ribeirão do Pântano, na confluência do rio Mogi Guaçu. Bacia do rio Grande, alto rio Paraná. Descalvado. SP. 21º 56' 00'' S / 47º 34' 00'' W
Hypostomus spp.	MZUSP não tombado	Tie08 012, 013, 017-024	Rio Passa Cinco, sob a ponte na SP 191, a cerca de 1 km da entrada de Ipeúna, município de Ipeúna, SP. 220 25.845' S / 47o 41.786'W

identificação	no. de tombo	no. da amostra	localidade
H. aff. ancistroides	UNESP 439	5758	Córrego Água Boa, bacia do rio Mogi Guaçú. Bacia do rio Grande. Aratas. SP. 22º 23,004' S / 47º 25,819'' W
H. gr. emarginatus	MZUSP 97505	7239	Rio Jamanxim, na Prainha, próximo a Novo Progresso. Bacia do rio Tapajós. Novo Progresso. PA. 07o 03' 52'' S / 55o 26' 28'' W
H. gr. emarginatus	MZUSP 97653	TP07 085	Rio Teles Pires. Bacia do rio Tapajós. Itaúba. MT. 10o 58' 30'' S / 55o 44' 03'' W
H. gr. emarginatus	MZUSP 96598	7101	Rio Peixoto de Azevedo, afluente do rio Teles Pires, próximo a cidade de Peixoto de Azevedo. Bacia do rio Tapajós. Peixoto de Azevedo. MT. 10o 13' 14" S / 54o 58' 02" W
H. gr. emarginatus	MZUSP 96325	6173	Tributário da margem direita do rio Peixoto de Azevedo, afluente do rio Teles Pires. Bacia do rio Tapajós. Peixoto de Azevedo. MT.
Peckoltia breviceps	MZUSP não tombado		procedência de aquariofilia
Scobynancistrus sp.	MZUSP não tombado		procedência de aquariofilia
Hypancistrus sp. bola	MZUSP não tombado		procedência de aquariofilia
Hypanscistrus sp. pigmentado (2ex.)	MZUSP não tombado		procedência de aquariofilia
Pseudacanthicus	MZUSP não tombado		procedência de aquariofilia
Ancistrus cf. multispinnis	MZUSP não tombado		procedência de aquariofilia

identificação	no. de tombo	no. da amostra	localidade
Harttia sp.	MZUSP não tombado	PIPE09 028	Rio Curuá, imediatamente a jusante à barragem. Bacia do rio Xingu. Altamira. Pará.
Loricaria sp.	MZUSP não tombado	Grd09 043	Ribeirão do Pântano, na confluência do rio Mogi Guaçu. Bacia do rio Grande, alto rio Paraná. Descalvado. SP. 21º 56' 00'' S / 47º 34' 00'' W
Hisonotus sp.	MZUSP não tombado	Grd09 037	Ribeirão do Pântano, na confluência do rio Mogi Guaçu. Bacia do rio Grande, alto rio Paraná. Descalvado. SP. 21º 56' 00'' S / 47º 34' 00'' W
Neoplecostomus microps	MZUSP não tombado		Ribeirão Bonito, córrego que passa no Clube de Pesca 3 Vales. Bacia do rio Paraíba do Sul. São Jose do Vale do Rio Preto. RJ. 22º 13' 20.7" S / 43º 00' 51.7" W
Neoplecostomus sp.	MZUSP não tombado		Ribeirão Bonito, córrego que passa no Clube de Pesca 3 Vales. Bacia do rio Paraíba do Sul. São Jose do Vale do Rio Preto. RJ. 22º 13' 20.7" S / 43º 00' 51.7" W

## Anexo III

Árvore de máxima verossimilhança com 172 taxa representando todas as sequências obtidas para *H. ancistroides* e sequências de suas espécies mais próximas. Modelo evolutivo TrN+G +I; log Likelihood=-1919.89; Ts/Tv=18.5542; Gamma=0.2279; invariant=0.4945; SBL=0.13941740.

0.002





0.6050

Hanc\_100865.5 Hanc\_100865.3 Hanc\_100865.2 Hanc\_100865.1 Hanc\_Tie011 Hanc\_Tie010 Hanc\_Tie007 Hancistroides\_UNESP\_32253 Hancistroides\_UNESP\_25935 Hancistroides\_Rib07\_0992 -Hancistroides\_UNESP\_32250 -Hanc\_100865.7 Hanc\_Rib059 Hanc\_Rib100 Hanc\_Rib058 Hanc\_Rib057 Hanc\_100865.11 Hanc\_100865.9 Hanc 100865.8 Hanc\_Tie006 Hanc\_Tie005 Hancistroides\_UNESP\_32288 Hancistroides\_UNESP\_32254 0.620 Hancistroides\_UNESP\_32252 <sup>1</sup>Hancistroides\_UNESP\_32251 Hanc\_Rib060 Hanc\_Rib081 Hanc\_Rib082 Hanc\_Rib083 Hanc\_Rib084 Hanc\_Rib085 Hanc\_Rib086 Hanc\_Rib087 Hanc\_Rib088 Hanc\_Rib089

Hanc\_Rib090 Hanc\_Rib091 Hanc\_Rib092 Hanc\_Rib093 Hanc\_Rib094 Hanc\_Tie001 Hanc\_Tie004 Hancistroides\_Rib08\_093 Hancistroides\_Rib08\_094 Hancistroides\_Rib07\_099 Hancistroides\_UNESP\_25885 Hancistroides\_UNESP\_27912 Hancistroides\_UNESP\_27913 Hancistroides\_UNESP\_28028 Hancistroides\_UNESP\_28029 Hancistroides\_UNESP\_28030 Hancistroides\_UNESP\_27911 Hancistroides\_UNESP\_27909

[ <sup>I</sup>	Hancistroides_UNESP_19535
I	Hanc_Grd144
I	Hanc_Grd150
I	Hanc_Grd149
I	Hanc_Grd148
I	Hanc_Grd143
I	Hanc_100867.5
I	Hanc_100867.4
I	Hanc_100867.3
I	Hanc_100867.2
I	Hanc_Ppn286
I	Hancistroides_UNESP_31947
0	.9500 [Hancistroides_UNESP_18626
Γ	Hancistroides_UNESP_18623
-	—— Hanc_Ppn287
0	.670 Hanc_Tie002
	Hanc Tie003

0.9850

