Sabrina Baroni

Estudos moleculares em Gymnotus pantherinus (Gymnotiformes, Gymnotidae): uma abordagem Sistemática e Filogeográfica

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

Orientador(a): Profª Drª Lurdes Foresti de Almeida-Toledo

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Baroni, Sabrina

Estudos Moleculares em *Gymnotus pantherinus* (Gymnotiformes, Gymnotidae): uma abordagem Sistemática e Filogeográfica

155 p.

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

1. *Gymnotus pantherinus* 2. drenagens costeiras 3. Filogenia 4. Filogeografia 5. estrutura de populações.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof. (a) Dr.(a) Prof. (a) Dr.(a)

_____ _____

Prof. (a) Dr.(a) Prof. (a) Dr.(a)

_____

Profa Drª Lurdes Foresti de Almeida-Toledo
Orientadora

À minha amada família

Pedro, Geni, Ana, Mônica e Sofia,

sempre!

Precisamos dar um sentido humano às nossas construções.
E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso, nos estiver deixando cegos,
saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo
e as aves do céu.

(Érico Veríssimo)

Agradecimentos

Deixo registrado aqui os meus mais sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Foram muitas as pessoas que participaram ou colaboraram de alguma forma na execução deste, as quais sou muito grata, seja pelo apoio técnico e científico, ou ainda pelo incentivo, amizade e carinho, por vezes tão necessários! E desde já aviso que a lista é grande...

À Prof.ª Drª Lurdes Foresti de Almeida-Toledo, por tudo que resume nossos sete anos de convivência. Pelo acolhimento, pela disposição e orientação, mas sobretudo, pela confiança e pela oportunidade.

Aos professores do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e do Departamento de Zoologia, agora que minha vida passou a ser dividida por essas duas grandes áreas do conhecimento, agradeço pela minha formação científica, pela qualidade do programa de Pós-graduação da USP e pelos ensinamentos, tanto profissional quanto pessoal.

Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Miguel Trefaut U. Rodrigues e Prof. Dr. Antônio Carlos Marques, meus chefes diretos no Departamento de Zoologia, principalmente pela compreensão com o meu estado de doutoranda. E ao Prof. Dr. Fernando Portella de Luna Marques por tantas coisas... desde a fase inicial de excecução do projeto, pela ajuda com o desenho experimental de *primers*, otimização das reações de amplificação e seqüenciamento, pela paciência com minhas discussões sobre os métodos de análises, disponibilização do *cluster*, enfim, do começo ao fim desse projeto sua ajuda foi inestimável.

Às secretárias do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, especialmente Deisy, Helenice e Neide, e do Departamento de Zoologia, Marly (santa Marly!), Fran, Maria Lúcia e Luzinéia, sempre prestativas e eficientes. Agradeço também aos

funcionários da secretaria de Pós-graduação e da Biblioteca do Instituto de Biociências.

À Luci Navarro, responsável pelo serviço de seqüenciamento do Instituto de Química da USP, pela eficiência com que desempenha seu trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Oliveira, pela gentileza em fornecer amostras de tecidos de outros *Gymnotus* e de *primers*.

Aos amigos do Laboratório de Ictiogenética e Laboratório de Sistemática Molecular (e mais alguns avulsos inclusos nesse tópico): Felippe L. Claro, Riviane Garcez, Ricardo S. Hattori, Vânia Pretti, Claudia Olivares, Denis J. Machado e Bianca, Ezequiel Ale, J. Cassimiro da Silva, Juliana Bardi, Karin Fehlauer, Lucília Miranda, Maíra Concistré, Marco Sena, Maximiliano M. Maronna, Manuel Antunes-Jr, Nathalia Mejia e Julian Esteban, Renata Cecília Amaro, Silvia Geurgas, Antoine Fouquet, Roberta Figueiredo e Fernando Nodari, Jéssica Gillung, Marcus V. Domingues e Verônica M. Bueno, pela agradável convivência e por TODAS as experiências compartilhadas nesse período. Nossa amizade fez com que esse processo se tornasse algo mais leve.

Aos amigos "externos", Janice M. da Cunha, Ilana Fichberg, Carine Chamon, Leandro M. Sousa, Katia Pellegrino, Bill, Tico Marcondes, simplesmente por vocês existirem e fazerem parte da minha vida!

Aos amigos da dança, porque a dança foi meu refúgio nos momentos de desespero, especialmente David e Carla, por aturarem as minha reclamações. E Paulão, parceiro do Zouk!

Às amigas queridas da "velha guarda" do LIUSP, Flora M.D.C. Fernandes, Maria de Fátima Z. D. Silva, Soraia B. A. Fonteles, Cinthia B. Moysés e Daniela Calcagnotto, pela amizade e inspiração. Só não agradeço pela saudade que vocês todas deixaram...

À todos os amigos que gentilmente me ajudam com a coleta dos *Gymnotus*: Antonio, Francisco, George, Janice, José Birindelli e, especialmente, Mauro Cardoso. Muito obrigada, não só pelos exemplares coletados, mas também pelos risos, ou pelas lágrimas (né, Maureba)! Meus agradecimentos se extendem também aos motoristas do

Instituto de Biociências, Marcelo, Pena, Valmir e Valdir.

À amiga Patrícia Faria, você é realmente uma pessoa especial! Agradeço pela amizade e também pela impecável revisão dos textos.

Ao amigo Almir Pepato, por toda ajuda e paciência com minhas análises bayesianas.

À todos os companheiros da ReGeneC 2009, em especial aos professores Antonio M. Solé-Cava, Cristina Yumi Miyaki, Daniel Ruzzante, Elie Poulin, Marco Mendes e a doce Tina (María A. Oliveira), pela experiência incrível vivida durante o *workshop*. Grande parte desse trabalho é fruto das aulas e discussões ocorridas durante o encontro.

E, de modo especial, ao nosso mais do que técnico, Carlos Eduardo Lopes. Amigo de todas as horas, presente nas alegrias, mas também nos momentos de angústia ou de incertezas... Consultor de todos os assuntos, não só profissionais quanto pessoais, você é uma pessoa incrível. Parceiro nas picadas de vespas e maior coletor de *Gymnotus* do mundo. Não seria nem preciso dizer que sem você esse trabalho não teria sido concluído da forma que está, pois a amostragem de *Gymnotus pantherinus* que obtivemos é resultado do seu esforço e dedicação. Enfim, não há palavras para expressar o meu carinho e a minha admiração por você. E agradeço também a Marta Canovas, igualmente amiga e companheira, e mais do que isso, obrigada por "dividir" o Carlos com a gente!

Finalmente, agradeço à minha família, a quem eu devo minha educação e meu caráter.

Índice

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Capítulo I – Introdução Geral..... 1

Capítulo II – Avaliação do *status* taxonômico de *Gymnotus pantherinus*, com base em marcadores moleculares mitocondriais e nucleares..... 28

Capítulo III – Estudo dos padrões demográficos de *Gymnotus pantherinus* (Gymnotiformes, Gymnotidae): um modelo de diversificação da ictiofauna em drenagens costeiras do sudeste/sul brasileiro..... 69

Considerações Finais..... 116

Resumo e Abstract..... 122

Referências Bibliográficas..... 125

Anexos..... 142

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Mapa da distribuição geográfica da Ordem Gymnotiformes, destacada em cinza..... 3

Figura 1.2 – Exemplos da diversidade morfológica do grupo: (a) *Apteronotus albifrons**; (b) *Eigenmannia virescens* (Fonte: *Fishbase*); (c) *Gymnotus sylvius*; (d) *Electrophorus electricus**. *Fotos obtidas da internet, autor desconhecido..... 5

Figura 1.3 – Exemplar de *Gymnotus pantherinus* coletado em São Lourenço da Serra-SP, drenagem do Alto Tietê..... 10

Figura 2.1 – Localidades amostradas no presente estudo: (1) Eunápolis-BA; (2) Mucuri-BA; (3) Linhares-ES; (4) São José do Vale do Rio Preto-RJ; (5 e 6) Cachoeiras do Macacu e Bairro Japuíba-RJ; (7) Angra dos Reis-RJ; (8) Piquete-SP; (9) Paraty-RJ; (10, 11 e 12) Ubatuba-SP, Núcleo Picinguaba e Serra de Taubaté; (13) Natividade da Serra-SP; (14) Bertioga-SP; (15) Santos-SP; (16) Paranapiacaba-SP; (17) Engenheiro Marcilac-SP; (18) São Lourenço da Serra-SP; (19) Itanhaém-SP; (20) Juquitiba-SP; (21) Juréia-SP; (22) Iguape-SP; (23) Subaúma-SP; (24) Cananéia-SP; (25) Ariri-SP; (26) Paranaguá-PR; (27) Piraquara-PR; e, (28) São Francisco do Sul-SC..... 35

Figura 2.2 – Procedimentos de campo adotados para coleta de *Gymnotus*. (a) Eletrolocalização e (b) captura dos indivíduos; (c) exemplar de *Gymnotus pantherinus*; (d) coleta de tecido; (e) Em detalhe, fragmento da cauda coletado para as análises moleculares; e (f) soltura dos exemplares após a coleta do tecido..... 36

Figura 2.3 – Árvore de consenso estrito obtida sob o critério de Parcimônia, por evidência total. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* e abaixo, os suportes de Bremer..... 47

Figura 2.4 – Árvore de consenso estrito obtida sob o critério de Parcimônia para os dados mitocondriais. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* e abaixo, os suportes de Bremer..... 48

Figura 2.5 – Árvore de consenso estrito obtida sob o critério de Parcimônia para os dados nucleares. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* e abaixo, os suportes de Bremer..... 49

Figura 2.6 – Árvore obtida por inferência bayesiana. Os números acima dos ramos representam as probabilidades posteriores..... 50

Figura 2.7 – Cromatograma parcial destacando a dupla leitura dos pontos de ambigüidade (*). Abaixo, foram descritos os dois alelos putativos em heterozigose e as posições ambígüas são destacadas em negrito..... 52

Figura 2.8 – Mapa parcial da região costeira do Brasil, mostrando em detalhe a localização geográfica das linhagens de *Gymnotus pantherinus* recuperadas pelas análises filogenéticas. As setas destacam as áreas da Serra do Mar que podem ter servido como barreiras geográficas durante a diversificação do grupo..... 68

Figura 3.1 – Localidades amostradas para os estudos populacionais: (1) São José do Vale do Rio Preto-RJ; (2 e 3) Cachoeiras do Macacu e Bairro Japuíba-RJ; (4) Angra dos Reis-RJ; (5) Piquete-SP; (6) Paraty-RJ; (7, 8 e 9) Ubatuba-SP, Núcleo Picinguaba e Serra de Taubaté; (10) Natividade da Serra-SP; (11) Bertioga-SP; (12) Santos-SP; (13) Paranapiacaba-SP; (14) Engenheiro Marcilac-SP; (15) São Lourenço da Serra-SP; (16) Itanhaém-SP; (17) Juquitiba-SP; (18) Juréia-SP; (19) Iguape-SP; (20) Subaúma-SP; (21) Cananéia-SP; (22) Paranaguá-PR; (23) Piraquara-PR; e, (24) São Francisco do Sul-SC. As principais regiões hidrográficas são destacadas em cores diferentes..... 75

Figura 3.2 – Compartilhamento de haplótipos entre as populações de Gymnotus pantherinus. Os haplótipos exclusivos de cada população são representados em cinza; os haplótipos compartilhados estão representados por cores..... 79

Figura 3.3 – Árvore de consenso estrito sob o critério de Parcimônia, mostrando a relação entre os 60 haplótipos amostrados. Os valores de *Bootstrap* são indicados acima dos ramos e abaixo, os índices de suporte de Bremer..... 84

Figura 3.4 – Rede de haplótipos mitocondriais de *Gymnotus pantherinus*. Três clados principais são recuperados, os quais apresentam clara associação geográfica..... 85

Figura 3.5 – Mapa parcial das drenagens destacando a proximidade geográfica das populações do Sul: (1) Paranaguá-PR; (2) Piraquara-PR; (3) São Francisco do Sul-SC, 1; (4) São Francisco do Sul-SC, 2; e, (5) São Francisco do Sul-SC, 3..... 99

Figura 3.6 – Representação esquemática simplificada das relações filogenéticas entre as populações. (1) MAC-RJ; (2) SJV-RJ; (3) PIQ-SP; (4) NAT-SP; (5) BER-SP; (6) PRP-SP; (7) EMA-SP; (8) SLS-SP; (9) JUQ-SP; (10) ITA-SP; (11) IGU-SP; (12) PAG-PR; (13) PIR-PR; (14) SFS-SC.... 104

Figura 3.7 – Mapa da superfície da América do Sul, destacando a plataforma continental. As setas em vermelho esquematizam o fluxo dos indivíduos nos períodos em que o nível do mar baixou, estabelecendo um possível contato entre as populações..... 108

Figura 3.8 – Consenso estrito das árvores de haplótipos construídas sob o critério de Parcimônia, delimitando grupos de populações que constituem Unidades Evolutivas Significativas. (a) Clado RJ; (b) Cachoeiras de Macacu e São José do Vale do Rio Preto, RJ; (c) Clado Norte de SP; (d) Clado SP/Sul; e, (e) Piraquara-PR e São Francisco do Sul-SC, riachos 2 e 3..... 114

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Exemplares de *Gymnotus pantherinus* incluídos na análise filogenética, marcadores seqüenciados para cada terminal e suas respectivas localidades de coleta..... 40

Tabela 2.2 – Temperaturas de hibridação dos *primers* usadas nas reações de amplificação..... 42

Tabela 2.3 – Número total de sítios seqüenciados, número de sítios variáveis e número de sítios informativos para Parcimônia em cada partição dos dados..... 44

Tabela 2.4 – Parâmetros relacionados ao modelo evolutivo selecionado para cada gene, utilizados na inferência bayesiana..... 46

Tabela 3.1 – Localidades de coleta dos espécimes de *Gymnotus pantherinus* e seus respectivos números amostrais..... 76

Tabela 3.2 – Sumário da diversidade genética estimada para as populações de *Gymnotus pantherinus*..... 81

Tabela 3.3 – Índice de Fixação entre pares de populações (diagonal inferior) e seus respectivos valores de significância (*p-value*, diagonal superior). Em vermelho, destaca-se os pares de populações que não demonstram estruturação. Os asteriscos vermelhos mostram os pares de populações que não mostraram diferenciação significativa pelo Teste Exato de Diferenciação..... 86

Tabela 3.4 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre os haplótipos mitocondriais de *Gymnotus pantherinus*..... 89

Tabela 3.5 – Resultado dos testes de Neutralidade e seus respectivos valores de significância..... 89

Tabela 3.6 – Comparação entre distância geográfica e distância genética entre as populações da região Sul do Brasil..... 96

- Capítulo I -

Introdução Geral

A ordem Gymnotiformes e a família Gymnotidae

Os peixes exibem uma enorme diversidade, tanto morfológica, como na exploração dos hábitats e, ainda, em sua biologia. Essa diversidade é, em parte, o que faz com que o entendimento da história evolutiva do grupo e o estabelecimento de uma classificação seja uma tarefa tão difícil (Nelson, 2006). Parte de toda essa diversidade está abrigada na região Neotropical, a qual mantém uma ictiofauna de água doce extremamente numerosa e diversificada, estimada em 4475 espécies válidas (Reis *et al*., 2003), embora esse número possa chegar a mais de 6000 quando consideradas as espécies ainda não descritas. A região Neotropical é marcada por histórias complexas de conexões e rupturas dos sistemas hidrológicos durante o tempo geológico, que geraram padrões igualmente complexos de distribuição da fauna e das relações entre os diversos táxons ocorrentes (Lundberg *et al*., 1998). Considerando-se a riqueza de espécies e a complexidade de seus padrões de distribuição, os conhecimentos sobre a diversidade genética e as relações filogenéticas entre as espécies neotropicais são ainda escassos.

A ordem Gymnotiformes é composta por um grupo monofilético de peixes endêmicos da região Neotropical, na qual são reconhecidas cinco famílias: *Apteronotidae*, *Gymnotidae*, *Hypopomidae*, *Rhamphichthyidae* e *Sternopygidae* (Albert & Campos-da-Paz, 1998; Albert, 2001; Nelson, 2006).

Revisões mais recentes reconhecem nessa ordem a existência de 30 gêneros e 134 espécies (Nelson, 2006), embora haja evidências de que muitas espécies ainda não estejam descritas, constituindo atualmente complexos de espécies (e.g., Moysés, 2005; Gonçalves, 2005; Milhomem *et al.*, 2008; Nagamachi *et al.*, 2010). Apesar da ampla distribuição geográfica da ordem, que se estende desde o rio Salado (La Plata) na Argentina, até o rio San Nicolas, em Chiapas, sul do México (Mago-Leccia, 1994), da costa do Pacífico à costa Atlântica (figura 1.1), é na região Amazônica que se concentra a maior diversidade de espécies de Gymnotiformes (Mago-Leccia, 1994; Lundberg *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 2004).

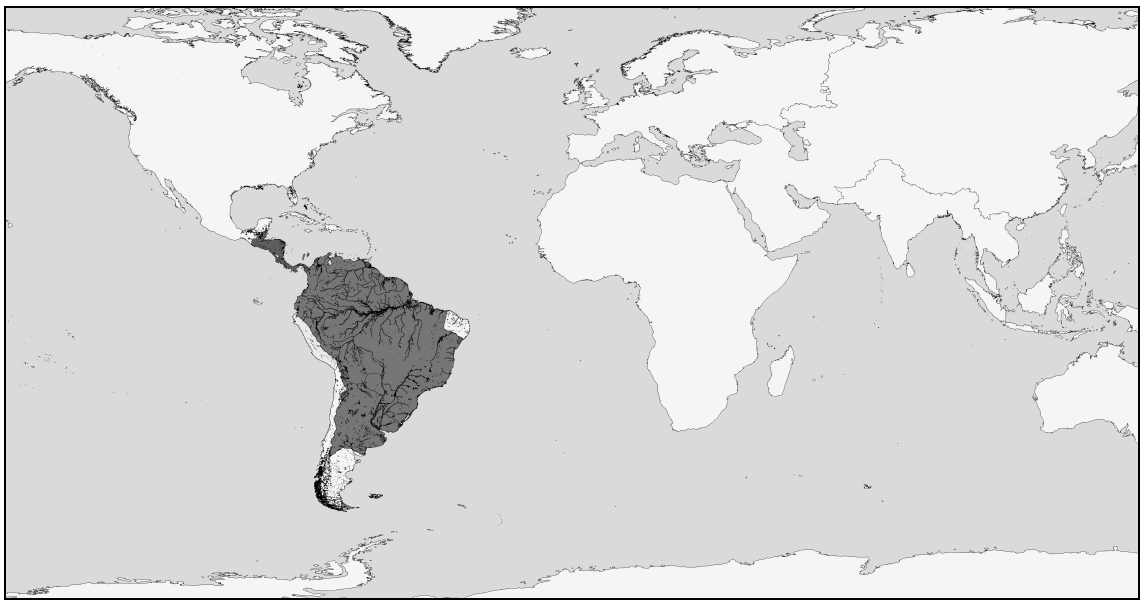

Figura 1.1 – Mapa da distribuição geográfica da Ordem Gymnotiformes, destacada em cinza.

Os Gymnotiformes se destacam em relação aos outros peixes neotropicais por apresentarem uma morfologia bastante distinta: possuem o corpo alongado

e lateralmente comprimido, com ausência das nadadeiras dorsal e pélvica; nadadeira caudal reduzida ou completamente ausente e nadadeira anal, bastante alongada (figura 1.2), responsável pela locomoção dos organismos através de movimentos ondulatórios, que permitem que os indivíduos se desloquem para frente e para trás (Mago-Lecia, 1994).

São peixes que possuem uma grande capacidade de regeneração dos tecidos e essa capacidade biológica pode por vezes dificultar a identificação taxonômica dos indivíduos, porque as cicatrizes formadas pelo processo de regenação alteram de certa forma a morfologia do animal, principalmente a região posterior do corpo, muito utilizada para a taxonomia. De hábitos noturnos, permanecem escondidos durante o dia em fendas, rachaduras ou outros locais protegidos. Alimentam-se preferencialmente de insetos aquáticos (particularmente *Chironomidae*) e pequenos crustáceos, embora espécies maiores, como *Eletrophorus electricus* e algumas espécies de *Sternopygus,* sejam também piscívoras.

Outra característica biológica marcante do grupo é a bioeletricidade. Todas as espécies de Gymnotiformes são capazes de emitir e detectar sinais elétricos fracos por meio de órgãos eletrogênicos e eletrorreceptores formados por vários tipos de células sensoriais especializadas denominadas eletrócitos (Shaffer, 1917; Lissmann, 1958). A atividade elétrica permite a comunicação, localização, forrageamento e a orientação em relação ao substrato à noite e no escuro, ou ainda em águas barrentas, o que contribui para o sucesso do grupo nos ecossistemas aquáticos Neotropicais (Crampton & Albert, 2006). As descargas elétricas produzidas pelos indivíduos são fracas, da ordem de milivolts, com exceção apenas da espécie *Eletrophorus electricus* (o popular

poraquê), capaz de produzir descargas elétricas fortes, da ordem de 500/600 V (Hopkins, 2009).

Figura 1.2 – Exemplos da diversidade morfológica do grupo: (a) *Apteronotus albifrons**; (b) *Eigenmannia virescens* (Fonte: Fishbase); (c) *Gymnotus sylvius*; (d) *Electrophorus electricus**. *Fotos obtidas da internet, autor desconhecido.

O primeiro registro fóssil de Gymnotiformes foi feito por geólogos petroleiros em depósitos aluviais do Alto Rio Moile, Bacia do Paraná, em uma floresta localizada cerca de 75 km a noroeste de Santa Cruz, na Bolívia (Gayet & Meunier, 1991; Albert & Fink, 2007). Exemplares incompletos foram encontrados na Formação Yecua, datata do Mioceno Superior, com aproximadamente 10 milhões de anos (Ma), constituindo a drenagem proto-Paraná. A dificuldade de atribuição a um táxon preciso fez com que os

espécimes fossem alocados em um novo táxon, nomeado como *Ellisella kirschbaumi* por Gayet & Meunier (1991), em homenagem a Max Ellis e Frank Kirschbaumi, os pioneiros nos estudos dos processos de crescimento e regeneração em Gymnotiformes. O gênero foi substituído subseqüentemente por *Humboldichthys*, uma vez que o nome *Ellisella* fora previamente atribuído a um celenterado (Gray, 1858) e a um gastrópode (Rohr & Huddleston, 1982) (Albert & Fink, 2007).

Albert & Fink (2007), investigando a posição filogenética dos fósseis, hipotetizaram que o holótipo *H. kirschbaumi* seria grupo irmão do gênero *Sternopygus*. O holótipo compartilha o opérculo estriado com espécies ainda existentes de *Sternopygus* e *Distocyclus*, e pode ser atribuído à família *Sternopygidae*, embora suas estrias sejam significantemente mais pronunciadas do que as estrias das espécies atuais. Incertezas acerca do posicionamento desses exemplares fósseis irão persistir até que um número maior de espécimes seja coletado (Albert & Fink, 2007). Ainda assim, o achado fóssil indica que a origem dos Gymnotiformes é relativamente recente, o que torna esse grupo de peixes especialmente interessante em estudos evolutivos e geológicos da América Latina, uma vez que, possivelmente, tenham se originado após a separação da Gondwana (Fernandes-Matioli, 1999).

Dentre os Gymnotiformes, a família *Gymnotidae* compreende espécies com a maior distribuição geográfica dentro da região Neotropical (Mago-Lecia, 1994). Durante muito tempo, *Gymnotidae* foi considerada uma família monotípica, contemplando apenas o gênero *Gymnotus*. Com a revisão sistemática e taxonômica realizada em 1998 por Albert e Campos-da-Paz, foi proposta a inclusão do gênero *Eletrophorus* nessa família, já que a similaridade

entre esses dois gêneros já fora noticiada por vários autores (Campos-da-Paz, 2003). Sendo assim, a família *Gymnotidae* atualmente inclui o gênero *Eletrophorus*, monoespecífico *(E. eletricus*) e o gênero *Gymnotus*, que conta atualmente com 35 espécies reconhecidas (Froese & Pauly, 2010) (anexo 1), e representa o gênero mais diverso dentro de *Gymnotiformes*, embora provavelmente existam muitas espécies ainda não descritas. Estudos recentes demonstram que a diversidade do gênero é bem maior do que a previamente reconhecida, em parte devido a limitações nos métodos de coleta e acesso aos hábitats (Gonçalves, 2005). Novos esforços de coletas e identificação, associados a caracterização das descargas elétricas e a estudos genéticos elevaram em muito o número de espécies descritas nos últimos anos (Albert & Crampton, 2003). Assim como a Ordem Gymnotiformes, a maior diversidade do gênero *Gymnotus* também ocorre na bacia Amazônica, onde são reconhecidas 18 espécies (Crampton *et al.*, 2005).

Albert *et al.* (2005) analisaram as relações filogenéticas do gênero *Gymnotus* com base em caracteres morfológicos. Os resultados obtidos corroboraram as hipóteses prévias acerca das relações intragenéricas, com o reconhecimento de três grupos principais: o grupo *G. cylindricus* representado por duas espécies da região central da América Central; o grupo *G. pantherinus* formado por 13 espécies com distribuição do Panamá ao Paraguai; e, o grupo *G. carapo*, composto por 16 espécies que se distribuem da encosta do Pacífico, na Colômbia, aos Pampas argentinos. O primeiro grupo apresenta-se basal em relação aos outros dois grupos da América do Sul, e espécies das encostas Pacífica e Atlântica dos Andes são encontradas dentro dos dois outros clados (grupo *G. pantherinus* e grupo *G. carapo*). Em estudo subseqüente, Lovejoy *et*

al. (2010) reanalisaram a filogenia do gênero, incorporando às matrizes morfológicas, dados moleculares obtidos a partir das seqüências gênicas: 16S, Citocromo b e RAG2. Os resultados obtidos nesse estudo recente corroboram alguns aspectos da proposta filogenética anterior (Albert *et al.*, 2005). Em ambos os estudos, a relação entre *Gymnotus* e *Electrophorus* tem bom suporte estatístico, corroborando a monofilia da família *Gymnotidae*. O grupo *G. carapo* também recebe alto suporte, em todas as análises conduzidas até o presente, além disso, o complexo *G. carapo* (*G. carapo*, *G. arapaima* e *G. ucamara*) também teve sua monofilia confirmada. Entretanto, o grupo *G. pantherinus* não se mostrou consistente no trabalho de Lovejoy *et al.* (2010). Este grupo apresentou-se subdivido em três clados principais: o grupo G1 (grupo irmão dos demais *Gymnotus*; incluindo *G. coropinae*, *G. stenoleucus, G. coatesi*, *G. jonasi* e *G. javari*); o grupo G2 (*G. cataniapo, G. pedanopterus* e *G. sp. cf. anguillaris*); e, *G. pantherinus*. O posicionamento de *G. pantherinus* aparece ambíguo dentre as diversas análises, recebendo suporte estatístico invariavelmente baixo.

***Gymnotus pantherinus*: uma espécie ou um complexo?**

Gymnotus pantherinus (Steindachner, 1908) é uma espécie facilmente diferenciada das demais espécies do gênero *Gymnotus* pelo seu padrão característico de coloração, formando manchas vermiculadas de tamanho variável em contraste com um fundo pouco pigmentado (figura 1.3). Apresenta ampla distribuição geográfica, tendo sua ocorrência atualmente reconhecida

para os rios costeiros do leste, sudeste e sul do Brasil, desde riachos contribuintes do complexo Laguna dos Patos, Estado do Rio Grande do Sul (Gonçalves, 2005) até o sul do Estado da Bahia (Campos-da-Paz, 1997; Reis *et al.*, 2003; Fonteles *et al.*, 2005). O fato dessa espécie não estar presente no Escudo Brasileiro, sugere uma história evolutiva de extinção ou ausência de colonização dessa porção continental (Albert *et al.*, 2005).

Os exemplares dessa espécie apresentam todas as sinapomorfias propostas para o gênero por Albert (2001) e Albert *et al.* (2005), sendo as mais facilmente identificáveis: boca superior com mandíbula prognata e posição dorso-lateral dos olhos. Distinguem-se dos demais membros do gênero pelo aspecto intermitente da linha lateral, que se apresenta interrompida em vários pontos ao longo de sua extensão (Gonçalves, 2005). Também apresentam a altura do corpo mais baixa em relação aos demais representantes do gênero, menor que 9% do CFA (comprimento até o final da nadadeira anal), ausência de faixas ou bandas pelo corpo em qualquer idade e número máximo de quatro fileiras de eletrócitos presentes no tecido eletrogênico da região posterior do corpo.

G. pantherinus ocorre exclusivamente em riachos costeiros e nas porções altas das drenagens do Rio Tietê e Iguaçu. Seu habitat é caracterizado basicamente por leitos formados por rochas e pedras, águas límpidas, temperaturas relativamente baixas e alta concentração de oxigênio dissolvido. Nos trechos onde a Mata Ciliar persiste, há menor incidência de radiação solar, o que determina valores mais baixos de temperatura. A mata contribui com material vegetal alóctone, o que torna a cor água avermelhada e mais ácida, por conta do grande aporte de material orgânico em decomposição (Oyakawa *et al.*,

2006). Ocupam preferencialmente os trechos rasos e estreitos dos rios, isto é, as porções mais próximas das cabeceiras, seja do rio principal ou de seus tributários. Por terem hábitos noturnos, são encontrados durante o dia junto à vegetação marginal, entocados no barranco na ausência da vegetação, ou ainda protegidos em meio às pedras que constituem o leito dos rios. A noite, transitam pelo rio em busca de alimentos e reprodução.

Figura 1.3 – Exemplar de *Gymnotus pantherinus* coletado em São Lourenço da Serra-SP, drenagem do Alto Tietê.

Campos-da-Paz (1997) analisando os Gymnotiformes das Bacias do Paraná, Paraguai, São Francisco e rios costeiros do leste do Brasil, reconheceu que indivíduos referidos de maneira tentativa a *Gymnotus pantherinus*, provenientes de localidades ao norte do Rio Doce (Estados do Espírito Santo e Bahia), apresentavam o corpo aparentemente mais alto do que os exemplares

encontrados na Serra do Mar, característica que poderia ser um indicativo da ocorrência de uma nova espécie nessa região e da existência de um complexo de espécies relacionadas, hipótese reforçada por Gonçalves, em 2002 (dados não publicados).

Muitos exemplares de *G. pantherinus* são encontrados em coleções identificados como *G. carapo,* apesar das diferenças marcantes entre as duas espécies, ou simplesmente como *Gymnotus sp*. ou *Gymnotidae*. A descrição original da espécie não apresenta figuras e tem poucas informações detalhadas. Motivado por essas observações, Gonçalves (2005) realizou uma revisão morfológica do grupo, com o objetivo de gerar uma descrição detalhada de *Gymnotus pantherinus*, estabelecendo os limites do táxon, além de descrever novas formas pertencentes a esse complexo. Baseado em caracteres morfométricos, merísticos e em padrões de coloração, os quais foram agrupados com base em uma característica supostamente derivada, o aspecto intermitente da linha lateral, Gonçalves (2005) redescreve a espécie a partir do material-tipo e de material de comparação proveniente de outras localidades. No mesmo trabalho, são definidas quatro novas formas pertencentes ao referido Complexo Pantherinus, distribuídas na região biogeográfica do leste/sudeste do Brasil: *Gymnotus* "Linhares", de bacias costeiras ao norte da foz do rio Doce; *Gymnotus* "Itapoá", de riachos costeiros no norte do Estado de Santa Catarina; e duas outras formas de ocorrência em contribuintes do complexo lagunar do sul do Brasil, *Gymnotus* "Laguna dos Patos" sp.1 e sp.2.

Segundo Gonçalves (2005), a distribuição geográfica da espécie *Gymnotus pantherinus* se dá em pequenas bacias costeiras entre a desembocadura do rio Paraíba do Sul e a bacia do rio Ribeira de Iguape, em

drenagens da Serra do Mar, originalmente cobertas pela Mata Atlântica. O rio de maior porte dessa região é o Rio Paraíba do Sul, onde a espécie é encontrada freqüentemente nos trechos altos e médios desse rio e afluentes, não havendo registros de captura nas porções baixas.

Origem da Diversidade Neotropical

Compreender os processos evolutivos que originam e mantêm a alta biodiversidade neotropical tem sido um desafio para os pesquisadores por mais de um século. Essa questão pode ser abordada de duas formas: definindo os processos ecológicos responsáveis pela manutenção da alta diversidade em áreas definidas, ou ainda, definindo os processos evolutivos e biogeográficos que promoveram a diversificação ao longo do tempo e do espaço (Moritz *et al.*, 2000).

De modo geral, as hipóteses de diversificação nos neotrópicos levam em consideração dois aspectos principais: a ocorrência de baixas taxas de extinção e/ou altas taxas de especiação. Argumenta-se que biotas tropicais tenham acumulado uma alta diversidade de espécies ao longo do tempo por ser uma região antiga e estável climaticamente (em comparação aos sistemas temperado ou boreal). Em princípio, essa hipótese é testável comparando-se o comportamento das taxas de extinção/especiação entre grupos-irmãos entre zonas tropicais e temperadas, ou entre áreas de diferente estabilidade (Moritz *et al.*, 2000).

As hipóteses a respeito dos fatores que promovem a diversificação estão

em essência preocupadas com o contexto geográfico da especiação ou ainda, em caso de alopatria, com os mecanismos de isolamento que promovem a diversificação. Dentre os modelos propostos, o modelo de refúgios tem sido o mais amplamente discutido (Vanzolini & Williams, 1970; Brown & Ab'Saber, 1979; Moritz *et al.*, 2000). Esse modelo propõe a especiação por alopatria, em refúgios florestais isolados em decorrência da retração das florestas, durante os períodos glaciais. Acredita-se que a especiação tenha sido especialmente conduzida pela expansão de áreas abertas durante o Último Máximo Glacial, ou ainda, em períodos glaciais anteriores, e as forças evolutivas predominantes que atuaram na diversificação entre os refúgios teriam sido, nesse caso, deriva genética e seleção disruptiva. É possível imaginar que, para grande parte da biota, a retração e expansão das florestas possa ter tido uma influência direta na diversificação dos organismos, uma vez que a diminuição do hábitat resultaria na redução das populações naturais, promovendo o isolamento entre os remanescentes e o aumento da deriva genética dentro de cada refúgio. Vários estudos têm demonstrado uma correlação entre os padrões de diversidade genética e as alterações climáticas e florestais ocorridas durante o Pleistoceno. Exemplos de tais padrões são vistos em aves (Cabanne *et al.*, 2008), anfíbios (Carnaval *et al.*, 2009), répteis e mamíferos (Grazziotin *et al.*, 2006; Carnaval & Moritz, 2008). Já para a fauna aquática de um modo geral, não é clara a influência que a retração das florestas poderia ter exercido na manutenção da viabilidade dos corpos d'água e de sua fauna intrínseca. Além disso, tem sido difícil conciliar essa escala temporal com a diversificação dos peixes de água doce, que na maioria dos casos, parece ter sido anterior ao Pleistoceno (Montoya-Burgos 2003; Hubert *et al.* 2007; Menezes *et al.*, 2008; Cardoso &

Montoya-Burgos, 2009).

Um segundo modelo de diversificação leva em consideração a existência de sistemas hídricos compondo barreiras à dispersão e ao fluxo gênico. Populações isoladas em cada margem do rio tendem a ser tornar gradativamente divergentes, desde que não haja fluxo gênico ou que esse seja restrito, até se tornarem espécies diferentes. Suporte empírico para esse modelo vem da observação de que os limites de espécies ou subespécies intimamente relacionadas muitas vezes coincidem com os principais rios da Amazônia. Tal padrão tem sido recorrentemente relatado para saguis e micos (Hershkovitz, 1977), várias aves (Haffer, 1978; Haffer, 1992; Haffer, 1997) e lagartos amazônicos (Avila-Pires, 1995; Moritz *et al.*, 2000). Em outras regiões hidrográficas, rios de grande porte parecem também ter relação com a divergência entre clados, como proposto por Pellegrino *et al.* (2005). Em um estudo filogeográfico realizado com lagartos da Mata Atlântica, *Gymnodactylus darwinii*, os autores demonstraram a existência de três filogrupos, cujo padrão de estrutura genética coincide com a presença de importantes sistemas hídricos da região (São Francisco, Paraguaçu, Jequitinhonha, Doce e Paraíba do Sul). Outros exemplos de lagartos que têm sua distribuição limitada pelos mesmos rios são *Tropidurus hispidus* e *Tropidurus hygomi*, que não ocorrem ao sul do Rio Paraguaçu, *Strobilurus torquatus*, que não ocorrem ao sul do Rio Doce e *Coleodactylus meridionalis*, que tem sua distribuição limitada ao norte do Rio Jequitinhonha (Rodrigues, 1987; Rodrigues, 1990). Embora pareça que os rios afetem apenas a distribuição dos organismos terrestres, a dispersão das espécies de peixes de água doce com comportamentos ecológicos particulares pode também ser influenciada pelos rios de grande porte (Hubert & Renno, 2006).

Por outro lado, a hipótese dos rios como barreiras apresenta também algumas controvérsias. Primeiramente porque ao longo de sua extensão, um rio apresenta diferenças significativas em sua conformação, seja em largura ou profundidade, o que afetará de modo diferencial as populações que habitam suas margens. Dessa forma, cada trecho do rio atua de modo particular sobre a estrutura das populações, podendo em alguns trechos ser menos efetivo do que em outros, onde permitiria fluxo gênico pelo menos parcialmente. Outro aspecto importante é que a origem e remodelagem dos rios está estreitamente relacionada com movimentos tectônicos de remodelagem do relevo, e separar tais componentes da história evolutiva dos organismos é uma tarefa praticamente impossível. Além disso, na Mata Atlântica, áreas compreendidas entre os principais rios são congruentes com as áreas preditas como remanescentes florestais do Pleistoceno, logo, torna-se difícil distinguir entre tais hipóteses alternativas.

Finalmente, uma outra importante hipótese de diversificação relaciona eventos paleogeográficos como principais eventos vicariantes. Postula-se que atividades geotectônicas associadas à formação e remodelagem do relevo, como a Cordilheira dos Andes e a Serra do Mar, por exemplo, sejam responsáveis pela separação de populações e subseqüente diferenciação, principalmente quando se trata de divergências mais profundas (pré-Pleistoceno) (Grazziotin *et al.*, 2006). Mudanças geomorfológicas inevitavelmente acarretam alterações nos cursos dos rios, ou ainda, na captura de drenagens por sistemas adjacentes (Montoya-Burgos, 2003; Hubert & Renno, 2006; Ribeiro, 2006), constituindo um importante agente vicariante para os organismos aquáticos.

Em relação à ictiofauna, Weitzman *et al.* (1988) sugeriram que a

especiação em Glandulocaudini (Characidae), e também em outras espécies de peixes presentes nas drenagens costeiras do Brasil, fosse resultante de um complicado sistema vicariante associado às flutuações do nível do mar ocorridas durante períodos glaciais e interglaciais do Pleistoceno. Entretanto, Menezes *et al.* (2008), revisitando o grupo em estudo baseado em dados morfológicos e moleculares, afirmam que o principal padrão de diversificação do grupo está claramente associado aos principais aspectos da evolução tectônica da porção sul da plataforma Sul-Americana Cis-Andina.

Evidentemente, os fatores que promovem a diversificação da fauna atuam de forma diferente em espécies diferentes, respeitando as características biológicas, ecológicas e reprodutivas de cada grupo. A intensidade da vicariância está diretamente associada à capacidade de dispersão de cada organismo, de modo que pode ser mais ou menos intensa em espécies diferentes que ocupam o mesmo hábitat. Indiscutivelmente, quando se trata de peixes de água doce, processos geomorfológicos responsáveis pela remodelagem das bacias hidrográficas constituem o fator primordial de diversificação, por meio da vicariância ou coalescência de linhagens biológicas. Entretanto, não necessariamente este seja o único fator responsável pela riqueza em espécie encontrada nos dias atuais.

Biogeografia Histórica das Drenagens Costeiras Brasileiras

A riqueza da fauna de peixes de água doce Neotropicais é resultado de milhões de anos de evolução desde a separação da Gondowana até os dias

atuais, entretanto, muito pouco ainda se sabe a respeito dos processos que promoveram tal diversificação. Vari & Weitzman (1990) atribuíram essa deficiência de hipóteses principalmente à falta de informação a respeito da sistemática, história filogenética e distribuição geográfica precisa para a maioria das espécies de peixes Neotropicais. Com o passar dos anos e mesmo com o aumento crescente dos estudos em Sistemática e Biogeografia, Ribeiro (2006) reconhece ainda um outro problema: a dificuldade de se associar as hipóteses filogenéticas existentes à história geológica do continente. Segundo Ribeiro (2006), a dificuldade dos biólogos em entender e sintetizar os processos geológicos constitui uma séria limitação ao nosso conhecimento sobre a biogeografia dos peixes de água doce Neotropicais.

A biogeografia histórica dos peixes de água doce fornece uma ligação natural entre a evolução biótica e geomorfológica de uma região, uma vez que a dispersão dos peixes depende exclusivamente das conexões entre os rios, e tais conexões são uma conseqüência direta dos processos geológicos ocorridos nessa região (Lundberg, 1993). O maior sistema de drenagens da América do Sul, por exemplo, desenvolveu sua atual conformação após vários episódios tectônicos, iniciados a cerca de 89 Ma atrás e culminando com a formação final dos Andes por volta de 10 Ma. Assim, a diversificação da fauna aquática foi dirigida pela ocorrência de múltiplos eventos de vicariância tanto quanto coalescência dos sistemas hídricos (Lundberg *et al.* 1998; Sivasundar *et al.*, 2001).

As maiores implicações biogeográficas para os organismos aquáticos da América do Sul são decorrentes da formação das paleodrenagens do escudo cristalino brasileiro. De acordo com o modelo proposto por Cox (1989), durante o processo de separação entre os continentes Americano e Africano, alterações

térmicas (conhecidas como Pluma Mantélica) desencadearam uma deformação arqueada por centenas de quilômetros de extensão durante a fase inicial de falhamento, o que impôs um característico padrão de drenagem, com rios correndo a partir do centro dessas deformações. Esse processo supostamente atuou em várias porções das margens continentais da África e América do Sul, dando origem a seis principais megadomos (1. Guiana/Guiné; 2. Nordeste Brasileiro/Nigéria; 3.Mantiqueira/Angola; 4. Uruguai/Sudoeste Africano; 5. Somuncurá; e, 6. Puerto Deseado). Tal padrão de drenagem se faz evidente até os dias atuais, como visto no Rio Paraná e nas cabeceiras do rio São Francisco. Além desses rios que evoluíram ao longo da borda da deformação arqueada, reativações tectônicas resultaram em drenagens que desenvolveram longas e sinuosas rotas sobre o escudo cristalino brasileiro ancestral, antes que desaguássem no recém aberto Oceano Atlântico (Potter, 1997; Ribeiro, 2006).

Com a separação completa da Gondowana, iniciou-se a história independente dos rios da margem Atlântica da América do Sul. Os rios que constituem as drenagens costeiras do leste/sudeste/sul do Brasil, formam uma série de bacias hidrográficas isoladas, compostas pelos seguintes sistemas hidrográficos primários: Paraguaçu, Contas, Jequitinhonha, Doce, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape, Itajaí e Jacui. Estes rios, ao lado de outras bacias menores, estão separados do escudo cristalino brasileiro por paisagens escarpadas e montanhosas (Ribeiro, 2006).

Segundo Cobbold *et al.* (2001), a idéia tradicional de que a margem Atlântica Brasileira constitui uma margem passiva, contrasta com o contexto tectônico que caracteriza a região. Um grande número de eventos sísmicos são relatados para o sudeste brasileiro e regiões vizinhas, datados do fim do

Cretáceo e Cenozóico. Padrões topográficos e drenagens são evidências de soerguimentos recentes, falhamentos e captura de rios, tudo isso como resultado de tectonismo ativo. No interior do continente, a crosta se mostra mais espessa do que o esperado para uma margem falhada, provavelmente decorrente do encurtamento sofrido no Cenozóico como resultado de uma tensão compressional lateral. Já a litosfera do sudeste do Brasil é relativamente mais fraca em relação às áreas cratônicas adjacentes, o que pode explicar porque essa região é sismicamente ativa e propensa a deformações.

Um sumário dos eventos tectônicos ocorridos no Brasil durante o Quaternário apresentado por Riccomini & Assumpção (1999) aponta a existências de falhas em quase todas as províncias geológicas brasileiras. Dentre elas, o Rifte Continental do Sudeste do Brasil sofreu o mais pronunciado evento de reativação de antigas linhas estruturais e formação de novas falhas. Tais atividades tectônicas do Quaternário promoveram, entre outras mudanças topográficas, rearranjos hidrográficos recentes decorrentes da captura de drenagens.

As Drenagens Costeiras do leste, sudeste e sul do Brasil correspondem a áreas de grande significado biogeográfico, apresentando um alto grau de endemismo em sua fauna de peixes. Padrões filogenéticos sugerem uma relação próxima entre os rios que correm para o Atlântico com os rios adjacentes das terras altas do escudo cristalino. Entretanto, pouco tem sido dito sobre a dinâmica dos processos geológicos relacionados aos eventos cladogenéticos entre estas áreas, embora, padrões de distribuição e filogenéticos sugiram uma íntima associação com a história geológica da margem continental passiva da América do Sul, desde o Cretáceo aos dias atuais (Ribeiro, 2006).

O estado de conservação dos riachos de Mata Atlântica

A Floresta Atlântica, ou Mata Atlântica como é conhecida no Brasil, ocupa a categoria de segundo grande complexo de florestas tropicais biodiversas brasileiras. É composta por muitos tipos e sub-tipos de florestas, tropicais ou subtropicais, em sua maioria florestas pluviais, mas não em toda sua área de distribuição. Dada a sua extensão, engloba grande diversidade climática e topográfica, resultando em um ambiente heterogêneo, o qual abriga uma expressiva diversidade de espécies, exibindo também um alto grau de endemismo (Oyakawa *et al.*, 2006). Tais características associadas à acentuada devastação e fragmentação florestal que tem sofrido, faz com que a Mata Atlântica apresente os mais elevados números de espécies ameaçadas de extinção. Em sua estruturação espacial primária, a Floresta Atlântica abrangia aproximadamente um milhão de quilômetros quadrados (Ab'Saber, 2003), embora atualmente, constitua um dos biomas mais ameaçados do mundo, restando apenas cerca de 5% de sua cobertura vegetal original. Mais de 60% das espécies mencionadas na Lista Vermelha da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MMA, 2009) têm distribuição conhecida nesse bioma. Em relação à Flora, mais de 55% das espécies ameaçadas de extinção também pertencem à Mata Atlântica (MMA, 2008). Apesar disso, o reconhecimento de cuidados especiais para conservação do ambiente aquático e dos grupos que nele existem nas florestas tropicais tem sido amplamente negligenciado (Menezes *et al.*, 2007). Justificativas para a conservação das florestas são usualmente associadas a diversidade de plantas e vertebrados terrestres, enquanto pouca preocupação tem sido demonstrada em relação aos peixes de água doce (Maitland, 1995). O

que normalmente se esquece é que a sobrevivência dos peixes, que se alimentam de invertebrados ou plantas alóctones ou demandam de certas condições físico-químicas da água propiciadas pelo ambiente externo, dependem da conservação das florestas para sua sobrevivência (Menezes *et al.* , 2007).

De toda a biodiversidade encontrada na Mata Atlântica, os peixes são os menos conhecidos do público geral, porque ocorrem em ambientes aquáticos bastante restritos, além de serem pequenos e com hábitos crípticos, ocultando-se sob pedras ou sob a vegetação ribeirinha. Pelo pequeno tamanho se tornam desinteressantes para a pesca, passando despercebidos pela maioria dos pescadores, até mesmo dos mais experientes (Oyakawa *et al.*, 2006).

Embora pouco conhecidos, os peixes dos riachos da Mata Atlântica representam um grande número de espécies, das mais variadas formas, cores e hábitos. Estes peixes mantêm um estreito vínculo com a floresta e sua sobrevivência, depende da preservação da Mata Atlântica e da conservação da qualidade e da quantidade das águas, seja pelo suprimento de alimentos, pela manutenção da temperatura ou das condições físico-químicas da água, entre outros fatores. A destruição das matas expõe os peixes à luz direta do sol e aos seus predadores, além de diminuir drasticamente a oferta de alimentos. A floresta é ainda de extrema importância para a manutenção dos cursos d'água, pois o solo da floresta age como uma esponja, mantendo o nível de saturação relativamente alto, fazendo com que o suprimento de água aos riachos e córregos seja contínuo (Oyakawa *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2007). Nessas condições, riachos de pequeno porte, os quais são a grande maioria constituintes das drenagens costeiras, possuem água o ano todo.

A ausência da cobertura vegetal, além de alterar o ciclo hidrológico,

reduzindo a quantidade de água no período de seca, provoca grandes enxurradas no período chuvoso, agravando o processo erosivo dos solos. Além do aporte de sedimentos erodidos promover o assoreamento dos rios, provoca também a turbidez das águas, antes límpidas e transparentes. A homogeneidade do substrato decorrente do assoreamento reduz a diversidade local porque espécies reofílicas são desfavorecidas pela diminuição do substrato rochoso, enquanto espécies generalistas e adaptadas a solo arenoso, são favorecidas (Casatti *et al.*, 2006, 2009). Por outro lado, o aumento na turbidez das águas pode afetar os padrões de abundância e distribuição das espécies visualmente orientadas, porque a transparência da água determina as condições de visibilidade subaquáticas e as respostas dos peixes às variações espaciais e temporais, a qual são adaptados (Menezes *et al.*, 2007; Melo *et al.,* 2009).

Não só o desmatamento tem sido uma ameaça aos sistemas aquáticos atualmente. O crescimento das cidades, das indústrias e da agricultura, tem também provocado a poluição dos rios e riachos, seja pelo aporte de esgoto doméstico e/ou industrial, ou ainda, pela contaminação das águas por pesticidas. A poluição por esgoto doméstico causa a eutrofização das águas e conseqüentemente a redução do oxigênio dissolvido. A contaminação por esgoto industrial ou pesticidas contaminam quimicamente as águas, interferindo diretamente na saúde de todos os organismos aquáticos.

Diante de alterações ecológicas tão severas, as populações de peixes sensíveis a estes fatores podem ser drasticamente reduzidas ou mesmo extintas localmente (Sarmento-Soares *et al.*, 1996). Embora os efeitos negativos da degradação ambiental sobre os rios e riachos sejam bem conhecidos e documentados, suas reais implicações às comunidades de peixes dos riachos de

Mata Atlântica são difíceis de serem mensuradas, porque os hábitos particulares de cada espécie faz com que respondam de modo diferencial aos efeitos da degradação/poluição. Além disso, os riachos costeiros são marcados por uma considerável diversidade de hábitats, seja decorrente da altitude, declividade, largura e profundidade da calha, temperatura e aporte de nutrientes. Ao longo de sua extensão, um riacho costeiro pode apresentar desde nascentes, corredeiras, cachoeiras e poços em altitudes mais elevadas, até brejos e poças temporárias em altitudes mais baixas (Gerhard *et al.*, 2004; Oyakawa *et al.*, 2006) e cada hábitat será mais ou menos prejudicado pelos efeitos da degradação dependendo de suas características ecológicas. De um modo geral, o que se sabe é que as alterações ambientais reduzem a taxa de riqueza de espécies a poucos grupos generalistas ou tolerantes às novas condições ambientais impostas (Couceiro *et al.*, 2007).

A alteração do hábitat em grande escala constitui ainda um grave problema para aqueles que estudam aspectos históricos da evolução e distribuição dos peixes nas regiões de Mata Atlântica. Além disso, segundo Menezes *et al.* (2007), a sistemática e biogeografia desses peixes não foram estudadas em profundidade, a não ser muito recentemente, o que dificulta ainda mais a visualização de padrões. Muitas espécies novas de peixes têm sido descritas nos últimos anos e acredita-se que muitas outras venham a ser descritas a medida que os esforços de coleta sejam ampliados. Segundo Menezes *et al.* (2007) o que temos no momento é um conhecimento fragmentado dos efeitos resultantes da degradação e destruição da Mata Atlântica sobre a fauna de peixes, depois de quase 500 anos de ocupação humana. A falta de conhecimento prévio sobre o estado original da ictiofauna torna falha nossa

estimativa sobre a perda da diversidade. O modo de se abordar esse assunto atualmente é comparando áreas onde a floresta foi preservada em sua integridade com áreas adjacentes degradadas. Entretanto, poucas áreas permanecem intocadas, de modo que as comparações não são totalmente satisfatórias.

Algumas características dos peixes de água doce, bem como de outros organismos aquáticos, são especialmente relevantes quando o assunto é conservação. Os hábitats são relativamente restritos à dispersão (mantendo-se as devidas proporções) e os organismos vivem confinados dentro de limites determinados (Maitland, 1995). Esse confinamento é acentuado nos riachos de Mata Atlântica, que apresentam leitos estreitos em sua grande maioria, principalmente quando se consideram as porções mais altas das drenagens e as regiões de cabeceiras. Isso conduz à diferenciação de muitas populações independentes, já que as populações perdem o contato entre si e o fluxo gênico cessa ou se torna reduzido.

Segundo Maitland (1995), as populações de peixes de água doce habitam unidades descontínuas, muitas vezes pequenas, dentro das quais há um significante movimento das águas, o que torna o hábitat de certa forma homogêneo, e assim, a população toda fica vulnerável aos efeitos da poluição e da degradação do hábitat. Esse fato faz com que a situação das espécies de peixes da Mata Atlântica seja ainda mais preocupante, já que o isolamento entre as populações tende a ser maior decorrente do tamanho limitado das drenagens e da baixa conectividade entre elas, e também porque o ambiente tem sido gradativamente agredido pelo crescimento das cidades e conseqüente devastação das florestas, além do descarte de poluentes urbanos e industriais

nos corpos d'água.

Um dos grandes desafios conservacionistas está em estabelecer formas de preservação de um alto número de espécies dentro de um custo aceitável. Dessa forma, a definição de *hotspots* de diversidade, onde excepcional concentração de espécies endêmicas possa ser encontrada, parece ser uma abordagem promissora (Myers *et al.*, 2000). Em relação aos peixes dos riachos de Mata Atlântica, Menezes *et al.* (2007) relatam que há uma grande dificuldade em se delimitar áreas de endemismo, pois, por definição, uma área de endemismo é uma área onde dois ou mais organismos sem interações mutualistas ou parasitárias entre si apresentam uma sobreposição completa em suas distribuições, algo que na realidade é bastante difícil de ser provado. Parte do problema está na deficiência do conhecimento dos padrões de distribuição das espécies de peixes da Mata Atlântica, dada a escassez de trabalhos desenvolvidos na região. Ainda assim, os sistemas de rios costeiros do leste brasileiro têm sido considerados como uma área de endemismo por diversos autores (Eigenmann, 1908; Vari, 1988; Menezes, 1996).

Os principais objetivos dos programas de conservação, fortalecidos por uma legislação eficiente, devem promover a recuperação e o gerenciamento dos hábitats. Enquanto isso, medidas a curto prazo podem ser úteis para minimizar os danos ambientais a longo prazo. Tais medidas incluem translocações de fauna, criação em cativeiro de espécies e reintrodução, ou ainda, a criopreservação de germoplasma (Maitland, 1995). Obviamente, decisões sobre o manejo de populações devem ser tomadas com base na história evolutiva do grupo e na acurada avaliação de seu *status* taxonômico, visando à preservação das espécies com entidades dinâmicas e capazes de se adaptarem às mudanças

naturais do ambiente (Frankham *et al.*, 2008).

Em resumo, e de acordo com Menezes *et al.*, (2007), os efeitos do desmatamento sobre as populações de peixes tropicais associados à floresta pluvial, não têm sido suficientemente estudados, embora observações de campo têm demonstrado que é menor o número e a variedade de peixes encontrados em áreas desmatadas quando comparadas com áreas florestadas.

Não ambicionamos salvar todos os peixes em perigo ou ameaçados, mas é importante tentar preservar a maior parcela possível da diversidade que ainda nos resta, havendo uma necessidade urgente da realização de estudos e levantamentos faunísticos, visando identificar de modo preciso prioridades de conservação dos ambientes aquáticos das regiões de Mata Atlântica do Brasil.

Esperamos que o presente trabalho possa contribuir para o entendimento dos padrões de diversificação e evolução de *Gymnotus pantherinus*, bem como para o gênero *Gymnotus* e ainda, futuramente, possa também contribuir para a conservação dos ambientes aquáticos da Floresta Atlântica Brasileira.

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal o estudo sistemático e filogeográfico do *c*omplexo de espécies *Gymnotus pantherinus* (Complexo Pantherinus), provenientes das Bacias do Atlântico Leste e Sudeste do Brasil, utilizando marcadores moleculares nucleares e mitocondriais.

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

1. Avaliar o *status* taxonômico de *Gymnotus pantherinus* com base em marcadores moleculares;
2. Avaliar a diversidade genética das populações, a existência de fluxo gênico e os níveis de estruturação entre as populações de *Gymnotus pantherinus*;
3. Verificar possíveis barreiras geográficas que possam ter influenciado a atual distribuição das populações e a eventual diversificação da espécie;
4. Testar a hipótese de captura de cabeceiras envolvendo as drenagens em estudo e analisar o efeito da Serra do Mar na diferenciação das populações;
5. Caracterizar Unidades Evolutivas Significantivas, que sirvam como referência para programas de manejo e conservação da região em estudo.

- Capítulo II -

Avaliação do status taxonômico de Gymnotus pantherinus, com base em marcadores moleculares mitocondriais e nucleares

RESUMO

Espécies emergentes são um enorme desafio para biólogos evolutivos, porque a reconstrução filogenética entre táxons de divergência recente geralmente apresenta baixa resolução. *Gymnotus pantherinus* é uma espécie de peixe endêmica das drenagens costeiras brasileiras e sua ocorrência tem sido relatada desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul. Evidências morfológicas sugerem que esse grupo constitua um complexo de espécies. No presente trabalho, análises filogenéticas com base em marcadores moleculares, mitocondriais e nucleares, foram conduzidas a fim de se avaliar o *status* taxonômico do grupo. As análises sob o critério de Parcimônia, bem como as inferências bayesianas, mostraram que o grupo é composto por cinco linhagens estatisticamente bem suportadas. Das cinco linhagens identificadas, aquela composta por espécimes da Bahia e Espírito Santo é também suportada por evidências morfológicas, a qual propomos que seja reconhecida como uma nova espécie. As demais linhagens, das quais a mais recente é a de *Gymnotus pantherinus* senso estrito, foram consideradas como espécies incipientes, demonstando um aspecto gradual do processo de especiação. Dessa forma, reconhecemos que a diversidade do grupo é maior do que previamente descrita e que o processo de vicariância entre as linhagens pode ser explicado por barreiras geográficas.

ABSTRACT

Emergent species constitute a challenge for evolutionary biologists since their phylogenetic reconstruction frequently present poor resolution. *Gymnotus pantherinus* is an endemic fish species found in the Brazilian coastal drainages occurring from Bahia to Rio Grande do Sul states. Morphological evidence has suggested that *Gymnotus pantherinus* might constitute a species complex. In the present study, the taxonomic status of *Gymnotus* species group has been evaluated using both mitochondrial and nuclear markers. Parsimony and Bayesian phylogenetic inferences showed that the group is composed of five well supported geographic lineages. From those, a well supported lineage constituted by the specimens from Bahia and Espírito Santo states is also corroborated by morphological data. Thus, it is suggested that this lineage be recognized as a new species within *Gymnotus*. The other lineages, from which the most recent representative is the *Gymnotus pantherinus* lineage itself, have been considered as incipient species, demonstrating the gradual aspect of the speciation process. In conclusion, the group's diversity is higher than previously reported and that geographical barriers might have influenced the vicariant process.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem sido observado um considerável aumento na aplicação de marcadores moleculares na análise de problemas relativos à sistemática e à genética de populações. Diversas técnicas de biologia molecular estão atualmente disponíveis para a detecção da variabilidade genética, viabilizando a obtenção de um grande número de marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Sunnucks, 2000; Schlötterer, 2004). Os avanços da genética molecular produziram um impacto significante na Taxonomia e Sistemática dos organismos, não somente por auxiliar o reconhecimento de novas espécies, mas também por elucidar as relações filogenéticas e os mecanismos de especiação envolvidos (Hillis *et al.*, 1996).

A ampla variedade de métodos moleculares atualmente disponíveis permite comparações utilizando marcadores nucleares ou mitocondriais, através do seqüenciamento direto ou ainda a partir de estimativas indiretas da divergência genética geradas por métodos que apresentam diferentes níveis de sensibilidade (Carvalho & Hauser, 1999). Os marcadores moleculares podem ser aplicados na investigação de três linhas principais: estudos de estrutura de populações; identificação dos limites taxonômicos das espécies; ou ainda, na construção de filogenias. Além do mais, quando associados a técnicas tradicionais de biogeografia e paleoecologia, podem contribuir sobremaneira para o entendimento da história evolutiva dos organismos (Moritz *et al.*, 2000).

A alta biodiversidade dos neotrópicos faz com que o estudo das forças evolutivas que promoveram tamanha diversidade seja extremamente desafiante. Apesar da relativa escassez de hipóteses filogenéticas e biogeográficas existentes

até o momento para as espécies de peixes de água doce neotropicais, é notável o aumento do uso de marcadores moleculares para essa finalidade. Um número crescente de estudos filogenéticos estão sendo conduzidos, baseados no seqüenciamento direto de DNA. Tais estudos tem sido de grande importância na elucidação dos processos evolutivos envolvidos na diversificação dos peixes de água doce neotropicais (e. g, Hubert *et al.*, 2007; Chiachio *et al.*, 2008; Lovejoy *et al.*, 2010) .

Nesse contexto, os peixes pertencentes à família *Gymnotidae*, exclusivamente neotropicais, constituem um interessante objeto de estudo. De todos os Gymnotiformes, as espécies do gênero *Gymnotus* são as mais amplamente distribuídas, constituindo o gênero mais diverso do grupo, contando com 35 espécies válidas (Albert and Campos-da-Paz, 1998; Albert, 2001; Lovejoy *et al.*, 2010; Froese & Pauly, 2010). Segundo Lovejoy *et al.*, (2010), a riqueza de espécies associada à ampla distribuição geográfica do gênero, exibindo diversos modos de exploração do hábitat e uso dos sinais elétricos, faz com que o grupo seja um excelente modelo para estudos da biogeografia das espécies e da diversificação da ictiofauna nos Neotrópicos.

Até muito recentemente, pouco era conhecido acerca das relações sistemáticas entre as espécies de *Gymnotus*, em parte devido à ausência de descrições adequadas para as espécies, sendo muitas delas agrupadas como *Gymnotus carapo* (Albert *et al.*, 1999; Albert and Crampton, 2003). Entretanto, estudos recentes demonstraram que a diversidade desse grupo é muito maior do que previamente reconhecida (e.g., Albert *et al.*, 1999; Albert & Crampton, 2001, 2003; Campos-da-Paz, 2002; Crampton *et al.*, 2003, 2005; Maldonado-Ocampo & Albert, 2004; Fernandes *et al.*, 2005; Richer-de-Forges et al., 2009).

Muitas espécies foram descritas na última década e outras várias, embora morfologicamente distintas, aguardam uma descrição formal (Lovejoy *et al.*, 2010). Outras espécies continuam a ser sugeridas como formas morfologicamente crípticas de *G. carapo* (senso estrito), com base em dados cariotípicos (Milhomem *et al.*, 2008; Nagamachi *et al.*, 2010).

Como já mencionado anteriormente (Capítulo 1), *Gymnotus pantherinus* é uma das espécies de *Gymnotidae* que tem sido sugerida como sendo um complexo de espécies, tendo em vista que seu *status* taxonômico vem sendo questionado com base em dados morfológicos (Campos-da-Paz, 1997; Gonçalves, 2005). *G. pantherinus* tem sua distribuição geográfica originalmente reconhecida para os rios costeiros do leste do Brasil (bacias isoladas de rios costeiros ao norte do Rio Doce, nos estados do Espírito Santo e Bahia) e rios costeiros do sudeste e sul do Brasil, sendo usualmente encontrada desde o Rio Grande do Sul até o sul da Bahia, normalmente nas porções altas e médias dos rios (Uieda, 1995; Campos-da-Paz, 1997; Gonçalves, 2005; e observação pessoal).

Embora os dados morfológicos apontem a heterogeneidade do grupo, os estudos realizados até o momento demonstram uma certa deficiência amostral para algumas localidades, principalmente com relação aos extremos da distribuição do grupo (norte e sul) e zonas intermediárias (por exemplo entre a foz do Rio Doce e a desembocadura do Rio Paraíba do Sul). O limite da distribuição ao norte, por exemplo, é limitado por registros de captura em Porto Seguro, Bahia, porém, não é certo de que a ausência da espécie mais ao norte não seja mera deficiência de captura.

O presente capítulo apresenta uma análise sistemática do grupo, baseada

em dados moleculares utilizando como fonte de evidência seqüências nucleotídicas do genoma mitocondrial (Atpase 6/8, Citocromo b, 16S rDNA e NADH desidrogenase subunidade 4) e nuclear (Íntron 1 da proteina S7 e Espaçador Transcrito Interno Ribossomal – ITS2). Objetivou-se no presente estudo avaliar o *status* taxonômico do Complexo Pantherinus, estimar as relações filogenéticas entre as linhagens existentes, além de contribuir para um maior entendimento dos processos de diversificação do grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares utilizados no presente estudo foram coletados ao longo das drenagens costeiras do leste, sudeste e sul do Brasil, na tentativa de se amostrar toda a área de distribuição conhecida para o grupo. A figura 2.1 mostra em detalhes os 28 pontos de coletas amostrados.

A coleta foi feita utilizando-se redes de mão de armação metálica e um aparelho detector de sinais elétricos, que consiste basicamente em um eletrodo ligado a um amplificador diferencial, de alta sensibilidade e com resposta em freqüência dentro da faixa audível. Cerca de 30 indivíduos foram capturados por ponto de coleta, dos quais apenas cinco foram sacrificados e depositados no Museu de Zoologia da USP (MZUSP) como testemunho. Dos demais exemplares, coletou-se um fragmento de tecido da cauda e os animais foram devolvidos com vida ao seu local de coleta. A figura 2.2 sintetiza os procedimentos de coleta adotados no presente estudo.

Para a análise filogenética foram utilizados dois ou três indivíduos

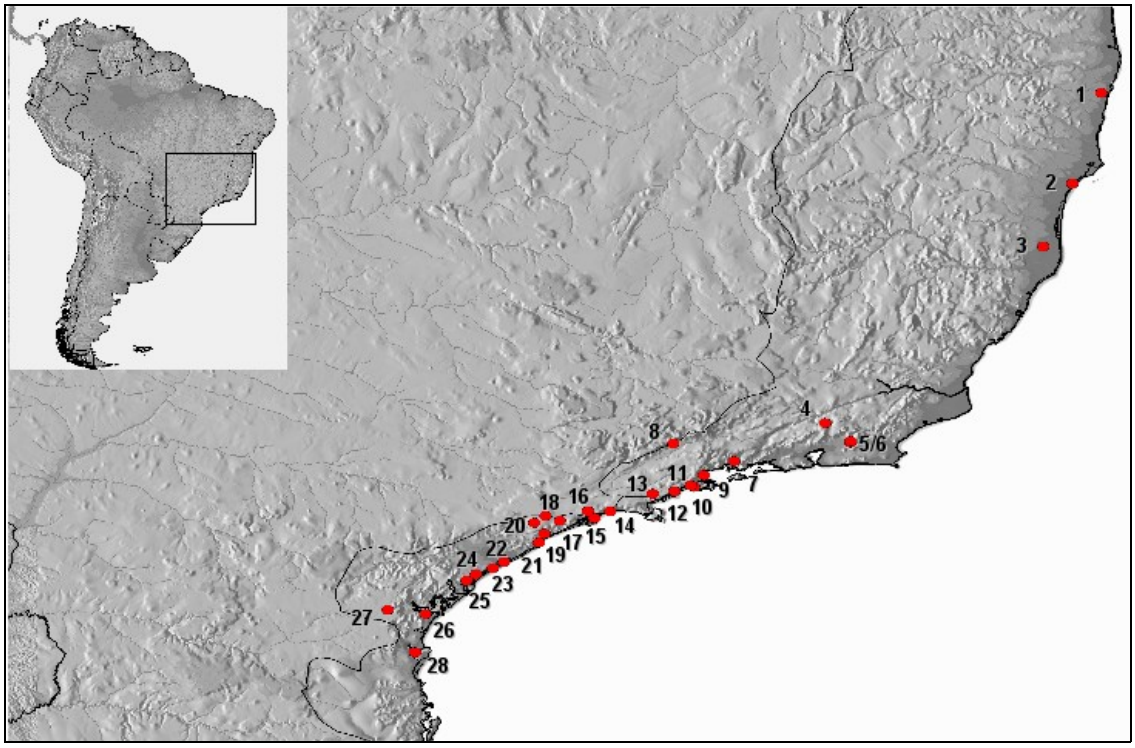

Figura 2.1 - Localidades amostradas no presente estudo: (1) Eunápolis-BA; (2) Mucuri-BA; (3) Linhares-ES; (4) São José do Vale do Rio Preto-RJ; (5 e 6) Cachoeiras do Macacu e Bairro Japuíba-RJ; (7) Angra dos Reis-RJ; (8) Piquete-SP; (9) Paraty-RJ; (10, 11 e 12) Ubatuba-SP, Núcleo Picinguaba e Serra de Taubaté; (13) Natividade da Serra-SP; (14) Bertioga-SP; (15) Santos-SP; (16) Paranapiacaba-SP; (17) Engenheiro Marcilac-SP; (18) São Lourenço da Serra-SP; (19) Itanhaém-SP; (20) Juquitiba-SP; (21) Juréia-SP; (22) Iguape-SP; (23) Subaúma-SP; (24) Cananéia-SP; (25) Ariri-SP; (26) Paranaguá-PR; (27) Piraquara-PR; e, (28) São Francisco do Sul-SC.

Figura 2.2 – Procedimentos de campo adotados para coleta de *Gymnotus*. (a) Eletrolocalização e (b) captura dos indivíduos; (c) exemplar de *Gymnotus pantherinus*; (d) coleta de tecido; (e) Em detalhe, fragmento da cauda coletado para as análises moleculares; e (f) soltura dos exemplares após a coleta do tecido.

representativos de cada população de *Gymnotus pantherinus* amostrada, conforme descrito na tabela 2.1. Como grupo externo, utilizou-se um indivíduo de cada uma das seguintes espécies: *Eletrophorus electricus, G. carapo*, *G. sylvius* e *G. pantanal*, uma vez que a relação de *G. pantherinus* com os demais membros do gênero permanece incerta (Lovejoy *et al*., 2010).

O DNA total dos exemplares foi extraído a partir de tecidos do fígado ou da nadadeira caudal, preservados em álcool 96%, de acordo com o protocolo tradicional de digestão com *Proteinase K* e purificação salina. Utilizou-se o *kit* de extração de DNA *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), segundo instruções do fabricante.

Foram seqüenciadas quatro regiões do genoma mitocondrial (Atpase 6/8, Citocromo b, 16S e ND4) e duas regiões nucleares (Íntron 1 da proteína S7 e ITS2). Os *primers* usados foram os seguintes:

1. Atpase 6/8: GATP + GCO3 – *primers* desenhados para o presente estudo, amplificam um fragmento de aproximadamente 700 pb.
   GATP: 5' CGACCACCCCTAGTGACATGCC 3'
   GCO3: 5' GTGCGAGAGTGGCAGATGCG 3'

2. Citocromo b: CytbL14841 (Kocher *et al*., 1989) + CB3-3' (Palumbi, 1996) – amplificam um fragmento de aproximadamente 650 pb, correspondente à porção incial (5') do gene.
   CytBL14841: 5' AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3'
   CB3-3': 5' GGCAAATAGGAARTATCATTC 3'

3. 16S: 16S-AR + 16S-BR (Palumbi, 1996) - amplificam um fragmento de aproximadamente 550 pb.

   16S-AR: 5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'

   16S-BR: 5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'

4. NADH desidrogenase subunidade 4: ND4 + LEU (Arévalo *et al.*, 1994) – amplificam um fragmento de aproximadamente 850 pb, correspondente à região 3' do gene, associada aos tRNAs localizados nessa porção.

   ND4: 5' CACCTATGACTACCAAAAGCTCATGTAGAAGC 3'

   LEU: 5' CATTACTTTTACTTGGATTTGCACCA 3'

5. Íntron 1 da proteína S7: S7RPEX1F + S7RPEX2R (Chow & Hazama, 1998) – amplificam o primeiro íntron do gene codificante da proteína ribossômica S7, de aproximadamente 650 pb.

   S7RPEX1F: 5' TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC 3'

   S7RPEX2R: 5' AACTCGTCTGGCTTTTCGCC 3'

6. Espaçador Ribossomal Transcrito Interno – ITS2: FISH5.8S-F + FISH28S-R (Pank *et al.*, 2001) - promovem a amplificação do Espaçador Intergênico localizado entre os genes ribossômicos 5.8S e 28S, com cerca de 800 pb.

   FISH5.8S-F: 5' TTAGCGGTGGATCACTCGGCTCGT 3'

   FISH28S-R: 5' TCCTCCGCTTAGTAATATGCTTAAATTCAGC 3'

As reações de amplificação foram realizadas em volume total de 25 ul, contendo 10-20 ng de DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 200 uM

dNTPs, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.4 uM de cada *primer* e 1.0 U de *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Fermentas). As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial por 4 minutos a 95°C; 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação dos *primers* conforme a temperatura ótima de cada primer (tabela 2.2), por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram checados em gel de agarose 1.5% e purificados com *Agencourt Ampure PCR Purification Kit*, conforme a recomendação do fabricante. Após a purificação, os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose 2%, juntamente com marcador de massa *Low DNA Mass* (Invitrogen).

As reações de seqüenciamento foram feitas com o *kit Big Dye Sequence Terminator v. 3.1,* conforme as instruções do fabricante. Foram seqüenciadas individualmente cada uma das fitas complementares (cadeia L e H) e o produto foi analisado em seqüenciador automático *ABI Prism Genetic Analyser* (3100).

As seqüências nucleotídicas obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no *GenBank*, utilizando-se a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; Altschul *et al.*, 1990), para a checagem da homologia com os genes de interesse e as seqüências codificantes de proteínas foram traduzidas a fim de se certificar de que não se tratavam de pseudogenes.

A edição das seqüências foi feita utilizando-se o programa Phred/Phrap (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998) e Consed (Gordon *et al.*, 1998), gerando os *contigs* para cada gene de cada indíviduo. Os *contigs* gerados foram importados compondo uma matriz de dados, por meio do programa *Bioedit* (Hall, 1999) e o alinhamento foi feito com o auxílio do programa *Muscle* (Edgar,

Tabela 2.1 – Exemplares de *Gymnotus pantherinus* incluídos na análise filogenética, marcadores seqüenciados para cada terminal e suas respectivas localidades de coleta.

Identificação	ATP	Cytb	16S	ND4	S7	ITS2	Localidade	Região Hidrográfica
ANG620	X	X	X	X	X	X	Angra dos Reis, RJ	Drenagens costeiras
ANG658	X	X	X	X	X	X	Angra dos Reis, RJ	Drenagens costeiras
ARI452	X	X	X	X	X	-	Ariri, SP	Drenagens costeiras
ARI454	X	X	X	X	X	-	Ariri, SP	Drenagens costeiras
ARI455	X	X	X	X	X	-	Ariri, SP	Drenagens costeiras
BER571	X	X	X	X	X	-	Bertioga, SP	Drenagens costeiras
BER572	X	X	X	X	X	-	Bertioga, SP	Drenagens costeiras
BER574	-	-	-	-	-	X	Bertioga, SP	Drenagens costeiras
BER575	-	-	-	-	-	X	Bertioga, SP	Drenagens costeiras
CAN456	X	X	X	X	X	X	Cananéia, SP	Drenagens costeiras
CAN458	X	X	X	X	X	-	Cananéia, SP	Drenagens costeiras
EMA128	X	X	X	X	X	-	Engenheiro Marcilac, SP	Tietê
EMA130	X	X	X	X	X	X	Engenheiro Marcilac, SP	Tietê
EUN007	X	X	X	X	X	X	Eunápolis, BA	Drenagens costeiras
EUN013	X	X	X	X	X	X	Eunápolis, BA	Drenagens costeiras
IGU472	X	X	X	X	X	-	Iguape, SP	Ribeira de Iguape / drenagens costeiras
IGU474	-	-	-	-	-	X	Iguape, SP	Ribeira de Iguape / drenagens costeiras
IGU476	X	X	X	X	X	X	Iguape, SP	Ribeira de Iguape / drenagens costeiras
ITA747	X	X	X	X	X	X	Itanhaém, SP	Drenagens costeiras
ITA748	X	X	X	X	X	X	Itanhaém, SP	Drenagens costeiras
JAP537	X	X	X	X	X	X	Cachoeiras do Macacu, Japuíba, RJ	Drenagens costeiras
JAP538	X	X	X	X	X	X	Cachoeiras do Macacu, Japuíba, RJ	Drenagens costeiras
JAP539	X	X	X	X	X	X	Cachoeiras do Macacu, Japuíba, RJ	Drenagens costeiras
JUQ520	X	X	X	X	X	X	Juquitiba, SP	Ribeira de Iguape / drenagens costeiras
JUQ522	X	X	X	X	X	X	Juquitiba, SP	Ribeira de Iguape / drenagens costeiras
JUR067	X	X	X	X	X	X	Juréia, SP	Drenagens costeiras
JUR069	X	X	X	X	X	X	Juréia, SP	Drenagens costeiras
LIN023	X	X	X	X	X	X	Linhares, ES	Drenagens costeiras
LIN025	X	X	X	X	X	X	Linhares, ES	Drenagens costeiras
MAC553	X	X	X	X	X	X	Cachoeiras do Macacu, RJ	Drenagens costeiras
MAC561	X	X	X	X	X	X	Cachoeiras do Macacu, RJ	Drenagens costeiras
MUC061	X	X	X	X	X	X	Mucuri, BA	Drenagens costeiras
MUC072	X	X	X	X	X	X	Mucuri, BA	Drenagens costeiras
NAT403	X	X	X	X	X	X	Natividade da Serra, SP	Paraíba do Sul
NAT405	X	X	X	X	X	X	Natividade da Serra, SP	Paraíba do Sul

Tabela 2.1 – Exemplares de *Gymnotus pantherinus* incluídos na análise filogenética, marcadores seqüenciados para cada terminal e suas respectivas localidades de coleta.

Identificação	ATP	Cytb	16S	ND4	S7	ITS2	Localidade	Região Hidrográfica
PAG691	X	X	X	X	X	-	Paranaguá, PR	Drenagens costeiras
PAG692	X	X	X	X	X	X	Paranaguá, PR	Drenagens costeiras
PAG693	X	X	X	X	X	X	Paranaguá, PR	Drenagens costeiras
PAR527	X	X	X	X	X	X	Paraty, RJ	Drenagens costeiras
PAR528	X	X	X	X	X	X	Paraty, RJ	Drenagens costeiras
PAR529	X	X	X	X	X	X	Paraty, RJ	Drenagens costeiras
PIC383	X	X	X	X	X	X	Picinguaba, SP	Drenagens costeiras
PIC384	X	X	X	X	X	X	Picinguaba, SP	Drenagens costeiras
PIQ4575	X	X	X	X	X	X	Piquete, SP	Paraíba do Sul
PIQ4580	X	X	X	X	X	X	Piquete, SP	Paraíba do Sul
PIR666	X	X	X	X	X	X	Piraquara, PR	Iguaçu
PIR670	X	X	X	X	X	X	Piraquara, PR	Iguaçu
PIR671	X	X	X	X	X	X	Piraquara, PR	Iguaçu
PRP082	X	X	X	X	X	X	Paranapiacaba, SP	Tietê
PRP084	X	X	X	X	X	X	Paranapiacaba, SP	Tietê
SAN496	X	X	X	X	X	-	Santos, SP	Drenagens costeiras
SAN503	X	X	X	X	X	-	Santos, SP	Drenagens costeiras
SFS600	X	X	X	X	X	-	São Francisco do Sul, SC	Drenagens costeiras
SFS601	-	-	-	-	-	X	São Francisco do Sul, SC	Drenagens costeiras
SFS603	X	X	X	X	X	X	São Francisco do Sul, SC	Drenagens costeiras
SFS604	X	X	X	X	X	X	São Francisco do Sul, SC	Drenagens costeiras
SFS610	-	-	-	-	-	X	São Francisco do Sul, SC	Drenagens costeiras
SFS611	X	X	X	X	X	-	São Francisco do Sul, SC	Drenagens costeiras
SJV790	-	-	-	-	-	X	São José do Vale do Rio Preto, RJ	Paraíba do Sul
SJV795	X	X	X	X	X	-	São José do Vale do Rio Preto, RJ	Paraíba do Sul
SJV799	X	X	X	X	X	X	São José do Vale do Rio Preto, RJ	Paraíba do Sul
SLS621	X	X	X	X	X	X	São Lourenço da Serra, SP	Tietê
SLS622	X	X	X	X	X	X	São Lourenço da Serra, SP	Tietê
SUB718	X	X	X	X	X	-	Subaúma, SP	Drenagens costeiras
SUB722	X	X	X	X	X	X	Subaúma, SP	Drenagens costeiras
TAU485	X	X	X	X	X	X	Ubatuba, SP (Serra de Taubaté)	Drenagens costeiras
TAU486	X	X	X	X	X	X	Ubatuba, SP (Serra de Taubaté)	Drenagens costeiras
UBA390	X	X	X	X	X	X	Ubatuba, SP	Drenagens costeiras
UBA398	X	X	X	X	X	X	Ubatuba, SP	Drenagens costeiras

2004).

As reconstruções filogenéticas baseadas nos critérios de Parcimônia e Inferência Bayesiana foram realizadas inicialmente para os diferentes genomas separadamente (nuclear e mitocondrial). As topologias recuperadas foram comparadas entre si com o objetivo de se identificar algum possível conflito. Em seguida, as mesmas análises foram feitas com os dados concatenados (evidência total).

Tabela 2.2 - Temperaturas de hibridação dos *primers* usadas nas reações de amplificação.

Pares de *primers*	**T º C**
GATP + GCO3	60
CytbL14841 + CB3-3'	55
16S-AR + 16S-BR	50
ND4 + LEU	53
S7RPEX1F + S7RPEX2R	53
FISH5.8S-F + FISH28S-R	60

As reconstruções filogenéticas baseadas no critério de Parcimônia foram conduzidas por meio do programa TNT (Goloboff *et al.*, 2008), utilizando-se o algorítmo de busca heurística com 1000 réplicas, sem atribuição de pesos aos caracteres, os quais foram considerados não ordenados. *Gaps* foram tratadas como dados ausentes por causa de ambigüidades no alinhamento dos genes nucleares, devido a eventos de inserção e deleção de nucleotídeos. O cálculo do *bootstrap* foi feito a partir de 1000 réplicas e plotado sobre a árvore de consenso

estrito resultante da busca heurística previamente conduzida. O índice de decaimento de Bremer (Bremer, 1994) foi calculado a partir de análises subótimas que retinham árvores até 100 passos acima do comprimento da árvore mais parcimoniosa.

A escolha do modelo de substituições nucleotídicas mais apropriado para ser utilizado nas análises Bayesianas foi realizada pelo programa *MODELTEST 3.6* (Posada & Crandall, 1998), usando a estatística de hLRT (teste hierárquico de razão de verossimilhança; Huelsenbeck & Crandall, 1997) para a escolha do modelo de evolução de seqüências de DNA que melhor se ajusta aos dados observados. As inferências Bayesianas foram feitas pelo programa *MrBayes 3.1* (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), a partir de 16.000.000 gerações, as quais foram amostradas a cada 800 réplicas, em duas corridas independentes. Para a construção do consenso final, foi descartado 25% das árvores iniciais. Os parâmetros da análise e a convergência dos resultados foram analisados no programa TRACER (Rambaut & Drummond, 2007).

RESULTADOS

As seqüências alinhadas constituíram uma matriz de dados composta por 2721 sítios para os dados mitocondriais e 1516 sítios para os marcadores nucleares, resultando em uma matriz com 4237 caracteres para os dados concatenados. A matriz mitocondrial teve a seguinte composição: Atpase (693 pb), Citocromo b (652 pb), 16S (554 pb) e ND4 (822 pb); enquanto a matriz nuclear foi composta por: S7 (662 pb) e ITS2 (854 pb). A tabela 2.3 sumariza as

informações a respeito das matrizes geradas para cada partição dos dados.

As matrizes de distâncias são apresentadas em anexo (anexos 2, 3 e 4). De um modo geral, os dados mitocondriais se mostraram mais informativos e com maior divergência do que os dados nucleares, como já era esperado por conta das características intrínsecas de cada genoma (Brown *et al.*, 1979; Harrison, 1989). A maior diferença registrada (considerando-se apenas o grupo interno) para o mitocondrial foi de cerca de 2.5%, para os exemplares de Eunápolis-BA e Linhares-ES em relação às localidades do sudeste/sul. Já para o nuclear, a maior divergência não ultrapassa 0.76%, registrada entre Angra-RJ x Japuíba-RJ/Macacu-RJ/Mucuri-BA. Quando concatenadas as matrizes, esse valor se mantém próximo de 2.2%, para a população de Eunápolis-BA em relação às populações do sudeste.

Tabela 2.3 – Número total de sítios seqüenciados, número de sítios variáveis e número de sítios informativos para Parcimônia em cada partição dos dados.

No. de sítios	Mitocondrial	Nuclear	Total
Total	2721	1516	4237
Variáveis	958	797	1439
Informativos para Parcimônia	479	179	564

A análise filogenética sob o critério de Parcimônia, a partir dos dados moleculares concatenados, resultou em 8208 árvores mais parcimoniosas, apresentando um comprimento de 1943 passos. A árvore de consenso estrito das 8208 árvores encontradas é apresentada na figura 2.3. O alto número de

árvores mais parcimoniosas encontrado é atribuído a ambigüidades no posicionamento de terminais representantes de populações pertencentes a cada uma das linhagens principais, de modo que os principais eventos cladogenéticos são congruentes em todas as árvores analisadas. Por esse motivo, obteve-se o comprimento dos ramos internos da árvore de consenso, e os ramos externos foram colapsados, como mostra a figura 2.3.

A análise de Parcimônia evidencia a existência de cinco linhagens principais: Clado 1, formado pelas populações de Eunápolis-BA, Mucuri-BA e Linhares-ES; Clado 2, composto pelas populações de Ubatuba-SP e Picinguaba-SP; Clado 3, pelas populações de Angra-RJ e Paraty-RJ; Clado 4, Cachoeiras do Macacu-RJ e São José do Vale do Rio Preto-RJ; e, Clado 5, engloba todas as demais populações ocorrentes ao sul de Bertioga-SP até São Francisco do Sul-SC. As cinco linhagens são recuperadas com altos valores de suporte dos ramos, os valores do índice de Bremer variam de 23 (clado 5) a 40 (clado 1) e os valores de *bootstrap* variam de 80 (clado 1) a 99 (clado 2). O clado 1, representado pelos exemplares da Bahia e do Espírito Santo, aparece como grupo-irmão das demais linhagens pertencentes ao grupo (figura 2.3).

A análise dos genomas mitocondrial e nuclear como matrizes separadas apresenta resultados similares. A topologia recuperada por meio dos genes mitocondriais é idêntica à topologia obtida por evidência total, como mostra a figura 2.4. Já a topologia resultante dos dados nucleares (figura 2.5) apresenta pouca resolução, recuperando apenas 3 dos clados presentes na árvore obtida com os dados concatenados: clado1, clado 3 e clado 4, e ainda assim, com baixo suporte (bremer = 1 - 4; *bootstrap*= 45 – 76).

Assim como descrito acima para a análise de parcimônia, também foram

geradas árvores para cada genoma separadamente (figuras não apresentadas) e para as matrizes concatenadas por inferência bayesiana. Os modelos evolutivos adequados foram selecionados para cada gene individualmente e os parâmetros selecionados são apresentados na tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Parâmetros relacionados ao modelo evolutivo selecionado para cada gene, utilizados pela inferência bayesiana.

	Atpase	**Cyt_b**	**16S**	**ND4**	**S7**	**ITS2**
nst*	6	6	6	6	6	2
rates*	gama	gama	gama	invgama	gama	gama

* especifica a complexidade do modelo: 2 = correção das taxas de transição/transversão; 6 = *General Time Reversible*.

** referente a taxa de mutação por sítio

A análise bayesiana conduzida para as matrizes concatenadas recupera as cinco linhagens principais também evidenciadas pelo método de parcimônia, como mostra a figura 2.6. Os clados 1, 2, 3 e 4 são recuperados com alta probabilidade posterior (> 96), enquanto o clado 5 apresenta probabilidade posterior de 81. O que difere entre as análises é o relacionamento entre as linhagens, o que será discutido posteriormente. A análise da matriz mitocondrial isoladamente recupera as mesmas linhagens, embora com probabilidades posteriores mais baixas (dados não apresentados). Novamente, a relação entre as linhagens se apresenta de modo diferente, mas com probabilidades posteriores baixas (59-83), o que tornaria tais clados sem resolução, formando uma politomia entre as linhagens. Assim como na análise por parcimônia, a matriz nuclear apresenta menor resolução, recuperando os

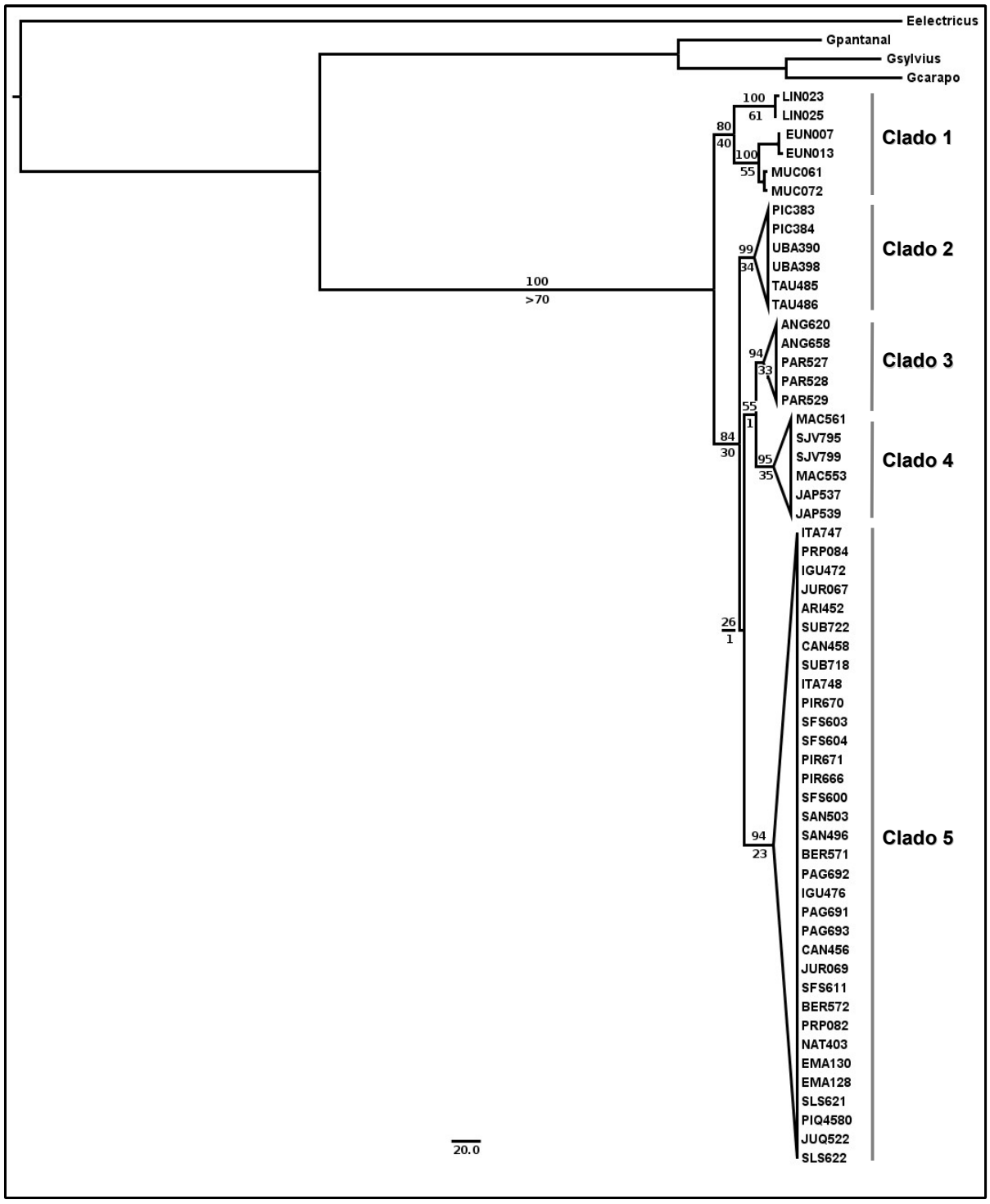

Figura 2.3 – Árvore de consenso estrito obtida sob o critério de Parcimônia, por evidência total. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* e abaixo, os suportes de Bremer.

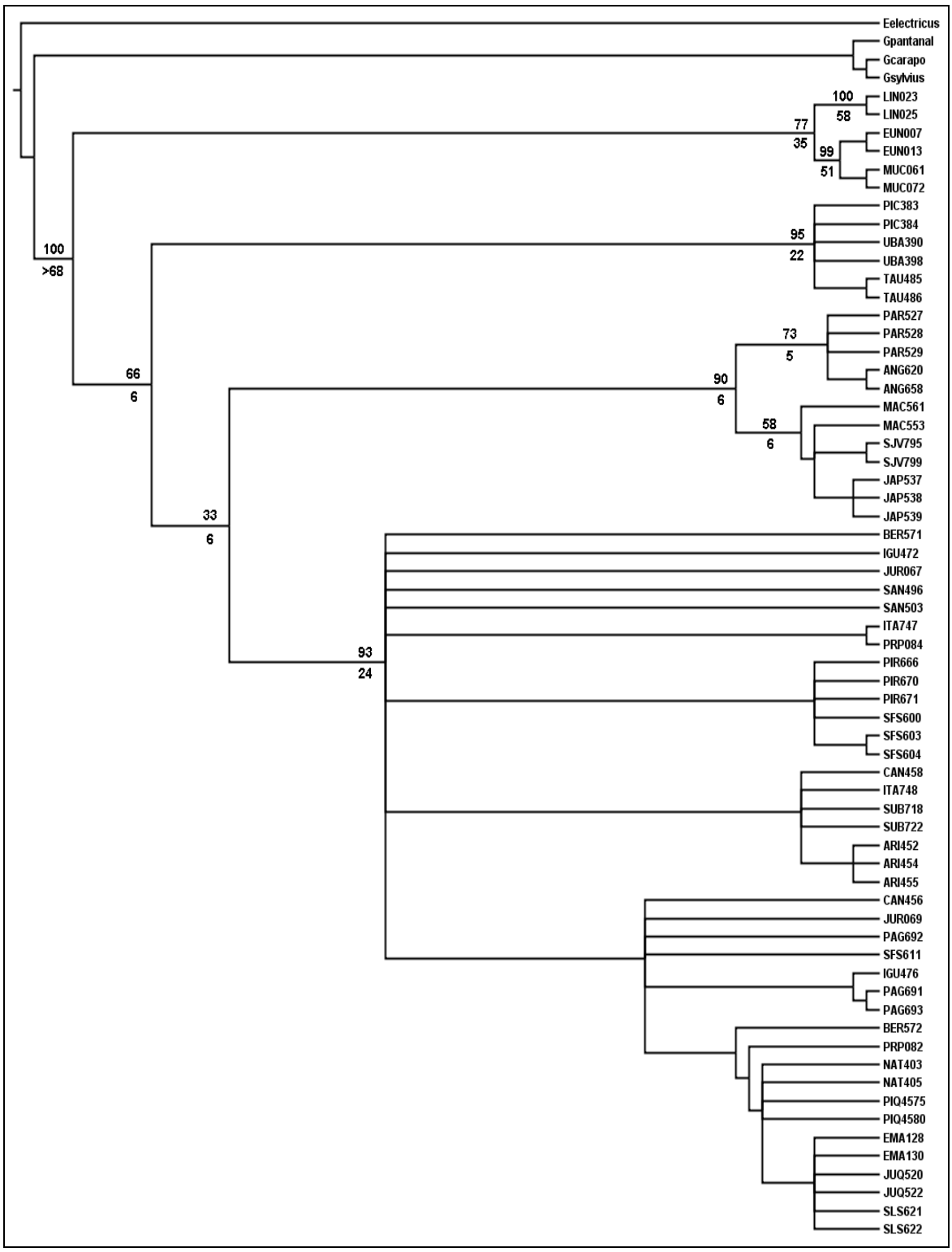

Figura 2.4 – Árvore de consenso estrito obtida sob o critério de Parcimônia para os dados mitocondriais. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* e abaixo, os suportes de Bremer.

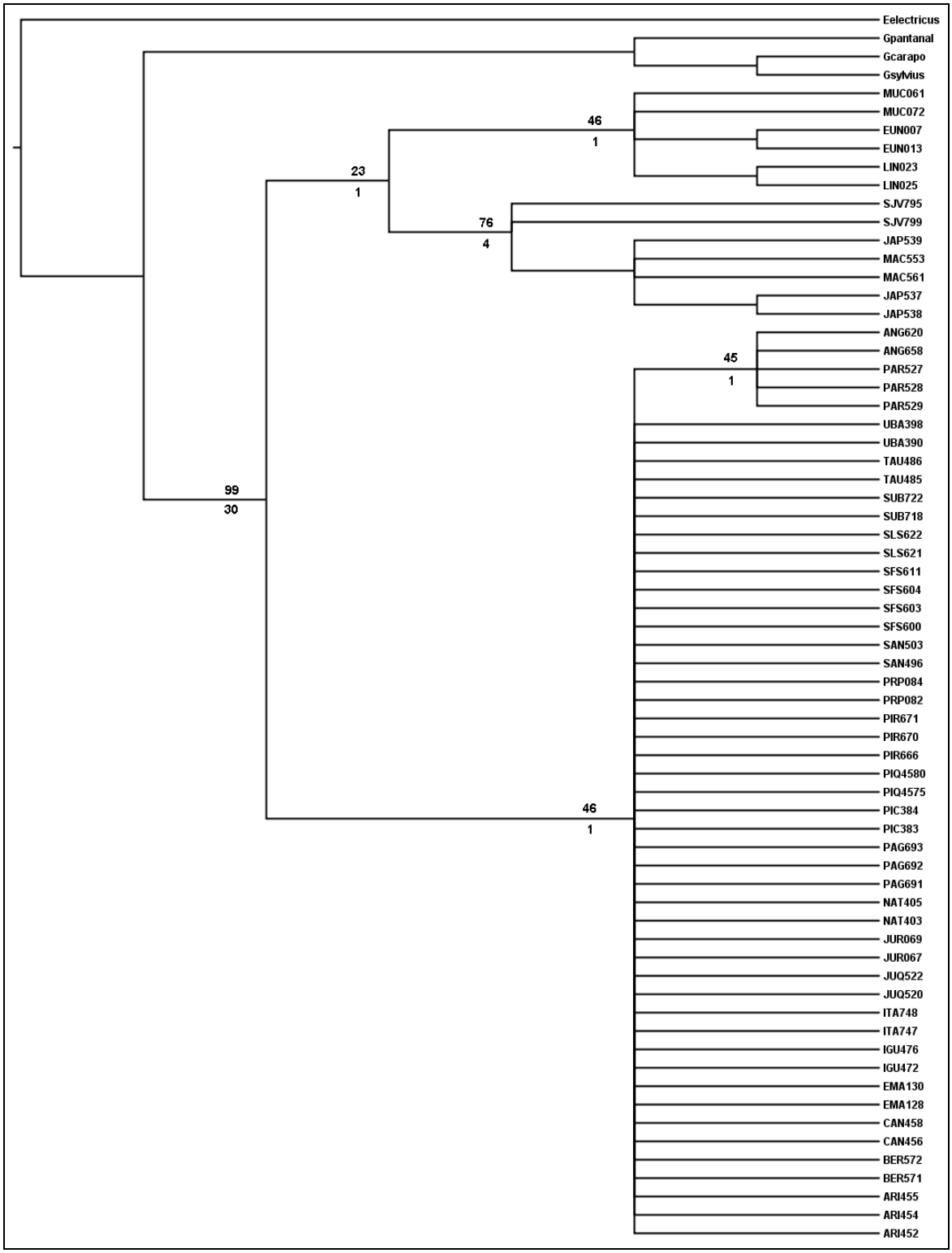

Figura 2.5 – Árvore de consenso estrito obtida sob o critério de Parcimônia para os dados nucleares. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* e abaixo, os suportes de Bremer.

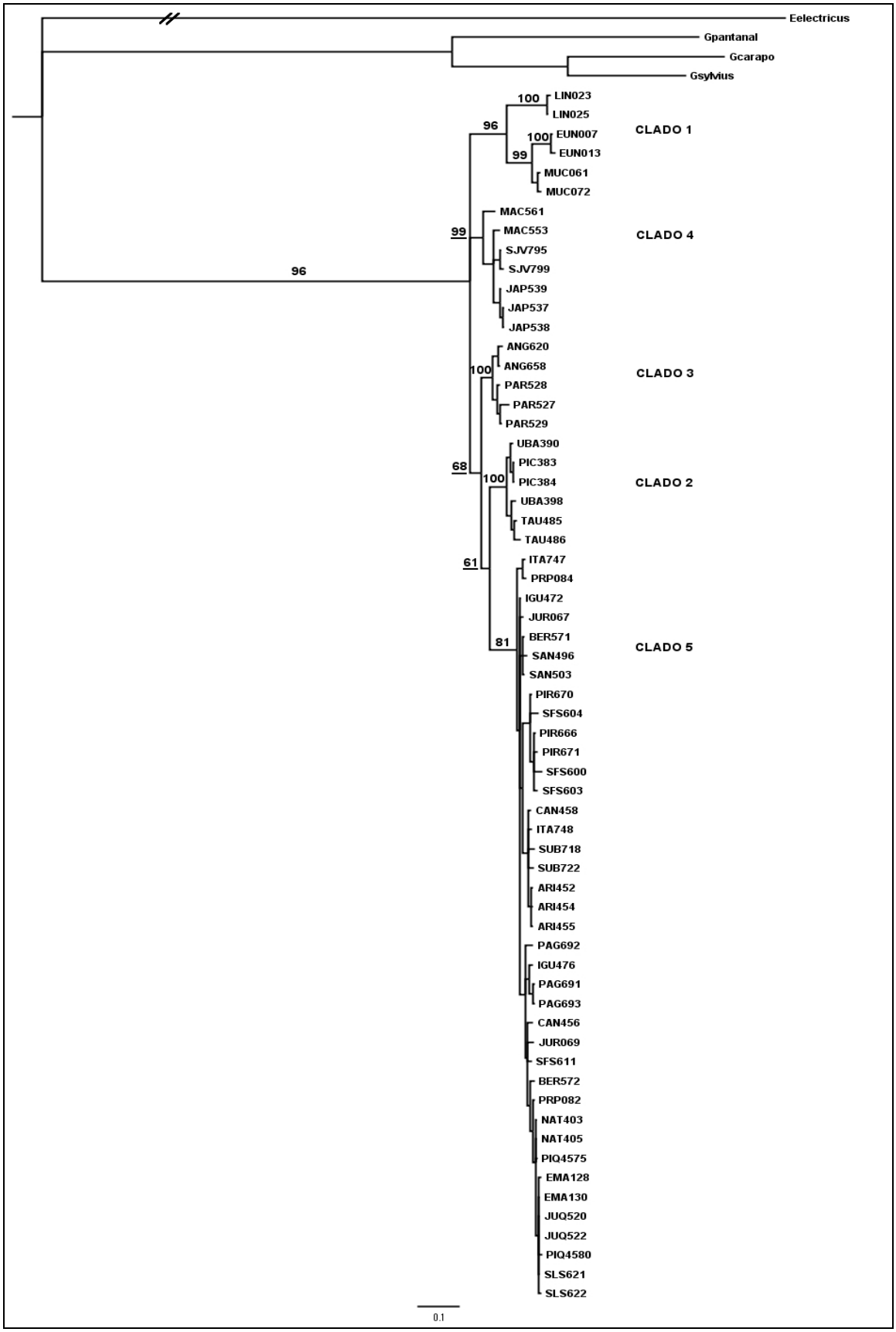

Figura 2.6 – Árvore obtida por inferência bayesiana. Os números acima dos ramos representam as probabilidades posteriores.

clados 1, 3 e 4 com altas probabilidades (96, 96 e 97, respectivamente) e o clado 2 com baixa probabilidade (56) (dados não apresentados).

Dessa forma, os resultados obtidos tanto por Parcimônia quanto por inferência Bayesiana são congruentes entre si, no que diz respeito a definição das linhagens encontradas para o grupo. Os dados também se mostraram congruentes em relação a informação entre os genomas, já que os resultados foram semelhantes tanto nas análises dos dados concatenados quanto das matrizes particionadas, embora o genoma mitocondrial tenha se mostrado muito mais informativo.

Considerações a respeito do seqüenciamento dos genes nucleares

Os *primers* utilizados para o seqüenciamento de íntrons nucleares ancoram nas extremidades conservadas dos éxons que os flanqueiam, de modo que o processo de amplificação possa replicar os fragmentos internos não-codificantes (Slade *et al.*, 1994). Esse procedimento aumenta a eficiência das reações de PCR porque os sítios de hibridação dos *primers* são sempre regiões conservadas.

Apesar das reações de amplificação dos genes nucleares terem sido conduzidas sem maiores problemas para os espécimes amostrados no presente estudo, as reações de seqüenciamento foram um tanto complicadas. Para alguns indivíduos, os cromatogramas gerados durante o seqüenciamento apresentaram um deslocamento de leitura, normalmente iniciado em regiões de nucleotídeos repetitivos, a partir da qual cada posição é nitidamente marcada por dois picos

de leitura bem definidos. A figura 2.7 mostra um cromatograma parcial, destacando o ponto onde a leitura perde a precisão.

Esse padrão foi recorrente no seqüenciamento dos genes nucleares para muitos exemplares, o que muito dificultou a obtenção do banco de dados adequado para as análises propostas. Nota-se que, por mais limpas que as seqüências estejam, nos pontos de ambigüidade há sempre a repetição de uma base imediatamente anterior (em alguns poucos casos, há a repetição de duas bases). Em casos menos problemáticos, foram encontrados pontos de deslocamento apenas na porção 5' do gene, tanto para o S7 quanto para o ITS2. Nos casos mais problemáticos, houve pontos de deslocamento tanto no fragmento 5' quanto 3' do gene, caso registrado apenas para o ITS2. Todas essas seqüências foram descartadas devido à impossibilidade da construção dos *contigs*.

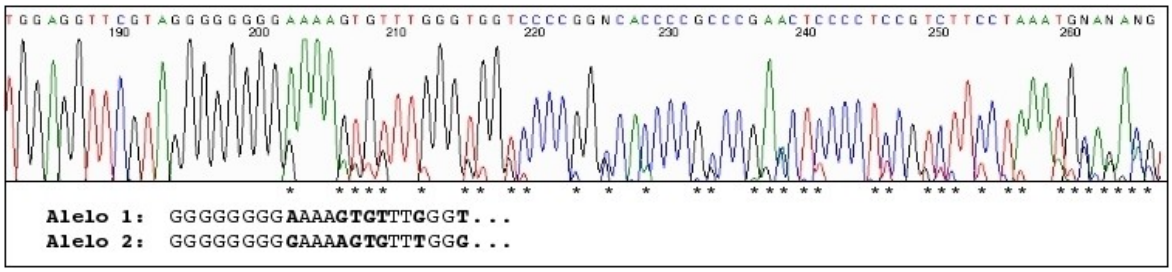

Figura 2.7 – Cromatograma parcial destacando a dupla leitura dos pontos de ambigüidade (*). Abaixo, foram descritos os dois alelos putativos em heterozigose e as posições ambígüas são destacadas em negrito.

Esse padrão problemático do seqüenciamento foi registrado com maior freqüência durante a obtenção do ITS2. Embora tenha ocorrido o mesmo

problema durante o seqüenciamento do S7, esses foram mais raros.

Considerando que em organismos diplóides os genes nucleares podem ser encontrados em homozigose ou heterozigose, e observando o padrão de deslocamento da leitura do seqüenciamento, atribuímos esse padrão à ocorrência de heterozigotos com diferença em tamanho, nos quais um dos alelos apresenta uma base a mais do que o outro, o que provocaria o deslocamento da leitura com subseqüentes picos duplos.

A hipótese de heterozigose é ainda reforçada pela constatação de que os indivíduos que mais apresentaram esse padrão de seqüenciamento são pertencentes as seguintes populações: Ariri, Bertioga, Cananéia, Iguape, Itanhaém, Paranapiacaba e Subaúma. Tais populações são coincidentemente aquelas que apresentam maior diversidade haplotípica para os genes mitocondriais (dados que serão apresentados posteriormente, capítulo 3), de modo que não seria surpreendente encontrar uma alta heterozigosidade para os genes nucleares também.

Sabe-se que a clonagem desses genes seria a maneira mais adequada de se identificar individualmente cada um dos alelos, embora essa não tenha sido nossa decisão de trabalho. Para resolver o problema do seqüenciamento sem comprometer o resultado das análises, as matrizes dos genes nucleares foram montadas a partir de individuos "homozigotos" seqüenciados primeiramente para o gene S7. A montagem da matriz do ITS2 foi feita a partir dos indivíduos previamente selecionados, embora muitos tenham ainda se apresentado "heterozigotos" para o ITS2. Nesse caso, tais exemplares foram substituídos por outros da mesma população, ou ainda, em alguns casos, tratados como dados ausentes (tabela 2.1).

DISCUSSÃO

Sobre a divergência dos genes

Filogenias produzidas a partir do DNA mitocondrial representam árvores gênicas que podem não ser congruentes com a equivalente árvore das espécies (Doyle, 1992; Giannasi, 2000; Edwards & Beerli, 2000; Ballard & Whitlock, 2004). O genoma mitocondrial proporciona uma única perspectiva evolutiva, já que o DNA mitocondrial (DNAm) é uma molécula única, fisicamente ligada para todos os sítios, com características específicas que a diferem do DNA nuclear (DNAn) (Ballard & Whitlock, 2004). Uma solução para esse problema é adicionar às análises *loci* independentes do genoma nuclear. Atualmente, os estudos em sistemática molecular têm fortemente reforçado a idéia de que as análises filogenéticas devam usar informação de múltiplos genes independentes, uma vez que os dados combinados têm produzido filogenias mais robustas (Slade *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2002; Crespi & Fulton, 2004; Calcagnotto *et al.*, 2005).

Uma das principais vantagens de se trabalhar com seqüências nucleotídicas é a possibilidade de escolher genes que apresentem variabilidade compatível com o problema filogenético abordado (Russo *et al.*, 1996). Deve-se considerar, primeiramente, que as taxas de mutação do genoma mitocondrial são geralmente mais altas do que as do genoma nuclear (Ballard & Whitlock, 2004). Brown *et al.* (1979), por exemplo, demonstrou que a taxa de evolução do DNA mitocondrial em primatas excede a fração de genes de cópia única do genoma nuclear cerca de 10 vezes. Por esse motivo, o uso de dados nucleares e a

abordagem combinada é mais eficiente em estudos filogenéticos de táxons que possuam divergência mais antiga (Giannasi *et al.*, 2001), situação na qual alguns genes mitocondriais podem apresentar saturação. Dessa forma, a combinação de genes com taxas evolutivas diferentes tende a melhorar a resolução dos diferentes níveis hierárquicos das relações filogenéticas. Outra vantagem de se trabalhar com marcadores de ambos os genomas está relacionado ao suporte oculto de cada marcador. Quando conjuntos de dados são combinados em uma análise, a matriz concatenada pode evidenciar relações não favorecidas pelos conjuntos de dados individuais (Gatesy *et al.*, 1999; de la Torre *et al.*, 2006).

Russo *et al.* (1996) afirmam que a obtenção de uma filogenia robusta depende mais do conjunto de dados utilizados do que do método de reconstrução empregado, de modo que se a escolha dos genes for cuidadosa, as chances de se recuperar a árvore verdadeira através da reconstrução filogenética será bem maior (Russo, 2001).

Assumindo que o grupo estudado apresenta divergência recente, optou-se por trabalhar com uma ampla matriz mitocondrial, incluindo um total de quatro genes, os quais apresentam taxas evolutivas diferentes. Os genes nucleares, apesar de serem reconhecidamente menos variáveis, nesse caso, foram importantes para aumentar a robustez dos resultados já que as análises individuais se mostraram congruentes.

As matrizes de distância claramente demonstram essa diferença nas taxas de evolução entre os genomas. A maior distância registrada entre pares de populações para o mitocondrial chega a 2.5%, enquanto para o nuclear não ultrapassa 0.76%. A média geral das distâncias par a par, calculadas a partir do

programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) para os genes mitocondriais usados no presente estudo é de 1.11%, enquanto para os genes nucleares é de 0.14%. Esses valores demonstram que os dados mitocondriais gerados para *Gymnotus pantherinus* são cerca de 12 vezes mais divergente do que os dados nucleares.

Dentre os genes mitocondriais, as maiores taxas de divergência foram registradas para Atpase e ND4, cuja média geral atinge 1.4 e 1.3%, respectivamente. O 16S foi o fragmento que apresentou a menor taxa média, 0.36%. Já para os nucleares, o ITS2 é mais váriavel, com média de 0.45% de divergência, enquanto o S7 apresenta apenas 0.14%. Ainda assim, esses valores são notadamente mais baixos que os mitocondriais.

Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas conduzidas no presente estudo revelam a existência de cinco linhagens bem definidas, pertencentes ao Complexo Pantherinus. Todas as reconstruções filogenéticas apresentadas, mesmo quando utilizados métodos de análises distintos, recuperam as mesmas linhagens de forma robusta. Quando as partições de dados foram analisadas separadamente, verificou-se grande congruência com os resultados da matriz concatenada, mesmo no caso dos dados nucleares, onde a quantidade de informação mostrou-se insuficiente para a resolução de todas as linhagens. No caso da partição mitocondrial, todas as linhagens foram recuperadas; no caso da partição nuclear, até quatro das linhagens são recuperadas, de modo que, dada a baixa taxa de divergência verificada para esse conjunto de dados, a falta de

resolução desta última linhagem possa ser decorrente do compartilhamento de polimorfismos ancestrais. Vale ressaltar que em todas as análises conduzidas a monofilia das linhagens foi corroborada.

O clado 1 inclui as populações amostradas na Bahia (Eunápolis e Mucuri) e Espírito Santo (Linhares), todas provenientes das drenagens costeiras do Atlântico Leste. O clado 2, comporta os exemplares de Ubatuba (SP), núcleo de Picinguaba e Serra de Taubaté. O clado 3, por sua vez, é composto pelas populações coletadas em Angra dos Reis e Paraty, no Rio de Janeiro, ambas também pertencentes às drenagens costeiras. Já o clado 4, é formado tanto por populações de drenagens costeiras (Cachoeiras do Macacu, RJ) e por uma população pertencente à drenagem do Rio Paraíba do Sul, a oeste da Serra do Mar (São José do Vale do Rio Preto, RJ). O clado 5 engloba todas as demais populações de *G. pantherinus*, desde de Bertioga (SP) até São Francisco do Sul (SC), contando também com populações de drenagens costeiras e drenagens adjacentes (Paraíba do Sul, Tietê e Iguaçu) (figura 2.3).

Nas análises de Parcimônia, o clado 1 aparece como grupo-irmão dos demais grupos, enquanto por inferência bayesiana, há uma tricotomia composta pelo clado 1, clado 4 e o clado formado pelos demais grupos (2, 3 e 5). Em ambas as análises, o clado 5 se mostra como o mais derivado do grupo (figuras 2.3 e 2.6). A maior incongruência entre os métodos diferentes de análises está no relacionamento entre as linhagens, o que não é surpreendente já que algumas dessas relações apresentam baixo suporte em ambos os métodos. Ainda assim, as análises sob o critério de Parcimônia parecem mais robustas, já que as probabilidades posteriores obtidas pela infêrencia bayesiana se encontram entre 61 e 68, valores considerados desprezíveis dada a forma como

é calculado. As probabilidades posteriores geradas pela inferência bayesiana são consideradas como a probabilidade daquele clado ser verdadeiro, baseada na freqüência em que o mesmo ocorre entre as árvores amostradas após o valor do logarítmo de verossimilhança atingir uma fase estacionária (Simmons *et al.*, 2004). Dessa forma, as árvores geradas pelas interações iniciais de Monte Carlo via Cadeias Markovianas, cujas probabilidades são sempre muito baixas, são descartadas da computação da probabilidade posterior, de modo que os valores serão sempre superestimados. Por outro lado, o critério de Parcimônia tem se mostrado robusto para estimar as relações entre linhagens proximamente relacionadas, ou seja, aquelas que apresentam comprimento de ramos curtos (Holder & Lewis, 2003). Por esses motivos, a relação entre as linhagens reconstruída por meio do método de Parcimônia foi adotada para a interpretação das relações de parentesco entre as linhagens de *G. pantherinus*.

O clado que aparece mais instável entre as análises é o clado 4. Para Parcimônia, o clado 4 é grupo irmão do clado 3, embora o suporte de Bremer (BS) para esse nó seja igual a 1 e o *bootstrap* igual a 55. Para a inferência bayesiana, esse clado é um dos que compõe a tricotomia basal. A dificuldade do posicionamento desse clado pode ser decorrente de uma limitação amostral já que as localidades adjacentes constituem a maior amplitude geográfica sem representantes amostrados (figura 2.1). A localidade mais próxima ao norte é Linhares, ao norte do Rio Doce. De fato não há registros de captura da espécie entre a foz do Rio Doce e a desembocadura do Rio Paraíba do Sul, mas ainda há dúvidas se a ausência de registros se dá pela inexistência dos peixes nessa faixa continental ou se os esforços de captura não têm sido eficientes para a detecção da espécie, já que são animais de difícil captura. Ao sul, a localidade mais

próxima amostrada é Angra dos Reis, extremo sul do estado do Rio de Janeiro. Nestas circunstâncias, é provável que os dados amostrais obtidos tenham sido insuficientes para determinar com precisão a posição dessa linhagem.

Analisando-se a árvore apresentada na figura 2.3, verifica-se um evento cladogenético bem definido e bem sustentado, entre o clado 1 e o clado formado pelos demais grupos (*bootstrap* = 100; BS > 70). É também bem sustentado o posicionamento do clado 2 (populações de Ubatuba, SP) como grupo-irmão dos clados 3, 4 e 5 (*bootstrap* = 84; BS = 30). Já o relacionamento entre as 3 linhagens restantes (clados 3, 4 e 5), apresenta baixo suporte estatístico (*bootstrap* = 26/55; BS = 1/1), com comprimento de ramos notadamente mais curtos do que os verificados para as demais linhagens, sugerindo que a diversificação possa ter ocorrido em um curto intervalo de tempo ou até mesmo simultaneamente (politomia dura) para essas linhagens.

Sobre a definição de espécie e o status taxonômico de <u>Gymnotus pantherinus</u>

Toda abordagem taxonômica inevitavelmente remete à discussão sobre o conceito de espécie. Inúmeros conceitos de espécie foram propostos ao longo do tempo, embora não exista ainda um consenso sobre a definição de espécie. Mayden (1997) identificou pelo menos 22 conceitos de espécies na literatura contemporânea. Obviamente, nem todos eles são significantemente diferentes um do outro ou mutuamente exclusivos.

Para muitas áreas da Biologia o conceito de espécie pode não ser

problemático no campo experimental, como para estudos comportamentais ou ecológicos, por exemplo. O problema surge quando se está interessado em comparar entidades taxonômicas, ou buscar uma interpretação histórica dos dados (Cracraft, 2000).

A Sistemática é a ciência fundamental da biodiversidade e as espécies, por sua vez, são as "partículas elementares" da Sistemática. Segundo Cracraft (2000), mais e mais sistematas reconhecem que há conseqüências diretas para cada conceito de espécie aplicado, afetando diretamente a diagnose das espécies e das populações, as estimativas de diversidade, o estudo histórico dessas unidades, o delineamento de áreas de endemismo, a caracterização demográfica, a compreensão dos padrões de fluxo-gênico, decisões sobre manejo, reprodução em cativeiro e até mesmo reintrodução de espécies, entre outros tópicos.

De uma forma simplista, as espécies podem ser vistas meramente como variedades (Darwin, 1859), embora não seja muito clara a descontinuidade entre variação individual, entre espécies ou entre táxons mais elevados (Carvalho & Hauser, 1999). Segundo os mesmos autores, a realidade biológica de uma espécie pode não ser sempre favorável a uma definição rígida, sendo mais útil para a compreensão da biodiversidade e dos nossos esforços de pesquisa reconhecer as imperfeições de cada conceito e aceitar exceções como um fato, ao invés de um incômodo conceitual.

Não é do escopo do presente estudo discutir os conceitos de espécie propostos, muito menos argumentar contra ou a favor de qualquer um desses conceitos. Trabalhamos com o conceito filogenético de espécie, uma vez que as ferramentas metodológicas empregadas em nosso estudo são aplicáveis a esse

conceito. Embora várias formulações do conceito filogenético de espécie tenham sido propostas (Wheeler & Meier, 2000), todas as versões concordam que o reconhecimento de uma espécie deva ser embasado primariamente em critérios de relacionamento filogenético (descendência) e não em relacionamentos reprodutivos (Avise, 2000), de modo que uma "espécie filogenética" corresponde a um grupo de organismos que compartilham um caráter, ou uma combinação de caracteres, herdáveis e exclusivos (Vogler & Desalle, 1994).

Nesse contexto, o uso de seqüências de DNA para a identificação de espécies tem sido uma proposta já bastante empregada (Meier, 2008). São inúmeros os exemplos de tal aplicação: desde aplicações forenses quando seqüências de DNA foram utilizadas para se demonstrar que a carne de baleia vendida na Ásia provinha de espécies ameaçadas de extinção (Palumbi & Cipriano, 1998); ou na identificação da espécie de esturjão a qual pertencia o caviar vendido na cidade de Nova Iorque (Birstein *et al.*, 1998); até aplicações taxonômicas, alavancadas recentemente com o crescimento exponencial das pesquisas sobre *DNA Barcode*. Em peixes por exemplo, até 2008 mais de 5000 espécies já haviam sido "codificadas", tendo em média de cinco exemplares por espécie seqüenciados (Ward *et al.*, 2008). Estes são, ainda, apenas alguns exemplos entre muitos outros que podem ser encontrados na literatura.

A maior dificuldade encontrada nos estudos taxonômicos está relacionada à definição dos limites de uma espécie. Nesse aspecto, estudos moleculares também têm dado sua contribuição, seja na corroboração e identificação de novas espécies (Petersen *et al.*, 2007, entre outros), ou ainda, na elucidação dos limites de determinada espécie cuja morfologia não apresenta distribuição discreta da variação (Memon *et al.*, 2006, entre outros). Além do

mais, não há dúvidas de que a descoberta de espécies putativas, baseadas em seqüências de DNA, crie novas oportunidades para a taxonomia tradicional. Uma vez identificado o padrão genético diferenciado, é relativamente fácil para um taxonomista focar sobre populações que provavelmente representem novas espécies (Meier, 2008).

No caso de *Gymnotus pantherinus*, o que se observou por meio dos dados moleculares foi a existência de cinco linhagens estritamente bem delimitadas, aqui definidas como clado 1, 2, 3, 4 e 5.

O clado 1 foi a linhagem que mostrou maior diferenciação em relação às demais linhagens, o que pode ser avaliado pelo comprimento dos ramos mostrado na figura 2.3 e pelas matrizes de distância apresentadas nos anexos 2, 3 e 4. Estudos morfológicos prévios, conduzidos por Campos-da-Paz (1997) e Gonçalves (2005) identificaram também diferenças morfológicas nas populações incluídas neste clado. Segundo os dados morfológicos, tais espécimes podem ser diagnosticados por apresentarem o corpo mais alto do que *G. pantherinus* (senso estrito) (8.0 – 8.3 % do comprimento até o final da nadadeira anal - CFA), maior altura da nadadeira anal (correspondendo a 3.5 – 4.1% da base da referida nadadeira) e por apresentarem ii + 12-13 raios na nadadeira peitoral. Os resultados moleculares demonstram ainda que esse clado é composto por duas linhagens bem definidas e com bom suporte estatístico: a primeira composta por indivíduos de Linhares (ES) e a segunda, pelos respresentantes do sul da Bahia. Tal diferenciação pode ser indício de uma especiação incipiente. Dessa forma, reforçamos a proposta de Gonçalves (2005) que o grupo deva ser elevado à categoria de nova espécie (*Gymnotus* sp. "Linhares").

Em relação aos clados 2, 3 e 4, não foram apontadas diferenças morfológicas congruentes com a estruturação e diversidade encontradas a partir dos dados moleculares. De acordo com Gonçalves (2005), a espécie *Gymnotus pantherinus* (senso estrito) consiste nas populações dos riachos pertencentes à Serra do Mar nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Entretanto, os dados moleculares demonstram que as populações definidas pelos clados 2, 3 e 4 constituem linhagens diferenciadas, altamente suportadas, principalmente pelo genoma mitocondrial, embora as seqüências nucleares recuperem também a maioria dessas linhagens. Portanto, considera-se que tais linhagens, definidas pelo presente estudo, constituam espécies incipientes. Considerando a baixa vagilidade dos organismos em estudo e sua preferência por hábitats de cabeceira, a diversidade verificada não é surpreendente, uma vez que o fluxo gênico se torna restringido pela própria biologia do animal, favorecendo a diferenciação entre as populações.

O clado 5, recuperado na presente análise, comporta a localidade-tipo (Santos, SP), sendo constituído pelas populações amostradas desde Bertioga (SP) até São Francisco do Sul (SC). Compreende as drenagens costeiras e parte das drenagens do Tietê, Paraíba do Sul e Iguaçu, presentes nas faces leste e oeste da Serra do Mar e também na face leste da Serra da Mantiqueira. Uma nova incongruência com os dados morfológicos fora encontrada para esse clado: as populações de Santa Catarina foram propostas por Gonçalves (2005) como pertencentes a uma nova espécie. Para tanto, a diagnose morfológica do grupo "Itapoá" é feita com base na distância entre focinho e nuca e a distância entre ânus e nadadeira anal. Entretanto, a relação entre as medidas tomadas durante a análise morfológica apresentam sobreposição da linha de tendência para a

maioria das relações tomadas, inclusive para a distância focinho-nuca considerada como diagnose do grupo. Ainda em relação às medidas de diagnose, há uma grande sobreposição para os demais grupos, com uma leve separação dos indivíduos "Itapoá", tornando questionável a qualidade do carater como diagnóstico. Dessa forma, como a diferenciação morfológica para esse grupo não é tão clara e não há evidência genética para a diferenciação desse grupo, sua elevação para o *status* de espécie nova não é justificada pelos resultados aqui apresentados.

Os estudos morfológicos destacam ainda a existência de duas outras espécies putativas pertencentes ao Complexo Pantherinus: *Gymnotus* "Laguna do Patos" sp1 e *Gymnotus* "Laguna do Patos" sp2. Infelizmente, não foi possível obter tecido de representantes desse grupo para os estudos moleculares, de modo que tais populações não puderam ser avaliadas. Espera-se que em um futuro bem próximo seja possível a ampliação dos nossos dados incorporando representantes dessas localidades em nossas análises.

A incongruência entre diversificação genética e fenotípica demonstra não somente taxas altamente variáveis da evolução molecular entre táxons, mas também uma correlação por vezes fraca entre os caracteres taxonômicos tradicionais com base no fenótipo e a extensão da divergência genética revelada através de ferramentas moleculares (Hauser *et al.* , 1998). A neutralidade dos marcadores moleculares também pode muitas vezes limitar sua capacidade de distingüir táxons que divergiram recentemente, enquanto características adaptativas, tais como os caracteres morfológicos usados em taxonomia, estão sob seleção natural e, conseqüentemente, podem divergir mais rapidamente (Carvalho & Hauser, 1999). Assim, é inapropriado supor que marcadores

moleculares podem fornecer a resposta final para a identificação das espécies, porque constituem, na realidade, um sistema de informação adicional, que pode ser usado para aumentar a resolução na investigação taxonômica (Mayden & Wood, 1995).

Sendo assim, dados os resultados moleculares obtidos no presente estudo e os estudos morfológicos disponíveis na literatura, pode-se concluir que o grupo atualmente reconhecido como *Gymnotus pantherinus* constitui um complexo de espécies, e que as populações localizadas ao norte do rio Doce (ES) devam ser elevadas à categoria de nova espécie. A espécie *Gymnotus pantherinus* (senso estrito) dessa forma, tem sua distribuição geográfica redefinida para a área compreendida entre a foz do rio Doce (ES) ao norte e São Francisco do Sul (SC) ao sul, embora a diversidade genética intraespecífica seja alta, sendo a espécie constituída por pelo menos quatro linhagens bem definidas, as quais refletem possivelmente um processo incipiente de especiação. Tal diversidade tem implicações importantes com respeito à conservação das espécies e dos hábitats. O grupo "Itapoá" não foi aqui corroborado e, por não haver evidências suficientes para que seja atribuído a uma nova espécie, sugere-se uma revisão dos caracteres morfológicos que se mostraram ligeiramente diferentes para esse grupo, para um maior número de exemplares, na tentativa de se elucidar processos evolutivos ligados a essa variação e avaliar se trata-se de uma variação intraespecífica ou não. Por fim, as populações do Rio Grande do Sul (sistema Lagoa dos Patos) deverão ser brevemente avaliadas sob a abordagem molecular aqui empregada, na tentativa de corroborar tanto sua identidade como espécie proposta pelas análises morfológicas, como também elucidar sua relação filogenética com as demais

espécies do Complexo Pantherinus.

Considerações biogeográficas

As drenagens costeiras do leste/sudeste brasileiro apresentam um alto grau de endemismo em sua fauna de peixes, representando áreas de grande significado biogeográfico. Entretanto, muito pouco se sabe ainda sobre a dinâmica dos processos geológicos relacionados a eventos cladogenéticos para a região (Ribeiro, 2006).

O padrão filogenético encontrado para o Complexo Pantherinus demonstra uma diversificação sentido norte-sul, sendo o primeiro evento cladogenético responsável pela separação entre *Gymnotus* sp. "Linhares" e *Gymnotus pantherinus* (senso estrito), o qual pode estar relacionado com a presença do rio Doce. Embora essa hipótese pareça mais adequada para a explicação da distribuição de organismos terrestres, a dispersão dos peixes de água doce que habitam ambientes especiais também pode ser afetada pela presença de rios de grande porte (Hubert & Renno 2006). Esse é o caso dos organismos em estudo, os quais não são encontrados em rios de médio e grande porte, de modo que as populações permanecem confinadas nas porções altas das drenagens, onde os riachos são estreitos e rasos. Nessas circunstâncias, um rio de grande porte como é o caso do rio Doce poderia facilmente atuar no isolamento reprodutivo entre as populações ao norte e ao sul de suas margens.

Os eventos cladogenéticos associados à diversificação entre as linhagens de *Gymnotus pantherinus* (senso estrito) parecem estar associados aos eventos

geomorfológicos responsáveis pelo soerguimento e remodelagem da Serra do Mar. Nota-se que as linhagens principais identificadas estão confinadas em áreas moldadas pelas porções mais altas da Serra do Mar (figura 2.8). O clado 2 (Ubatuba/Picinguaba, SP) está separado ao norte da população de Paraty-RJ e ao sul da população de Bertioga-SP por uma faixa da Serra do Mar que avança até o litoral, de modo que a planície costeira é praticamente inexistente nesses pontos. O clado 3 (Angra/Paraty, RJ) é formado por populações confinadas por uma configuração bastante semelhante, onde a Serra do Mar novamente avança até o mar, na região entre Angra dos Reis e Mangaratiba, RJ. Essa borda da Serra do Mar atinge nessas regiões suas maiores altitudes, terminando com uma borda escarpada e íngreme, possivelmente interrompendo qualquer conectividade entre os riachos dessa região.

Embora haja uma notável diferenciação entre as populações distribuídas no sentido norte-sul, não foi verificada diferenciação significativa no sentido leste-oeste, através da Serra do Mar. Vários trabalhos têm discutido a ocorrência de capturas de cabeceiras entre as drenagens costeiras e suas adjacentes, causando a mudança do curso de certos riachos e assim, promovendo a translocação de fauna entre sistemas adjacentes, o que pode explicar a falta de divergência encontrada nesse sentido para as populações de *G. pantherinus*. As análises filogenéticas conduzidas no presente estudo sugerem a ocorrência de pelo menos três eventos de captura de cabeceiras, envolvendo as seguintes localidades: (1) São José do Vale do Rio Preto-RJ, entre tributários do rio Paraíba do Sul, à oeste da Serra do Mar e drenagens costeiras à leste da Serra do Mar, representadas pelas populações de Cachoeiras do Macacu-RJ; (2) drenagens à oeste da Serra do Mar, contribuintes do Alto Tietê e Alto Paraíba do

Sul (Piquete, Natividade da Serra, São Lourenço da Serra e Engenheiro Marcilac – SP) e drenagens costeiras à leste da Serra do Mar; e, (3) as cabeceiras do rio Iguaçu, localizadas em Piraquara-PR, que exibem íntima relação com as populações à leste amostradas em São Francisco do Sul (SC). Esse padrão biogeográfico será discutido em mais detalhes no capítulo 3, em conjunto com as evidências demográficas que serão discutidas posteriormente.

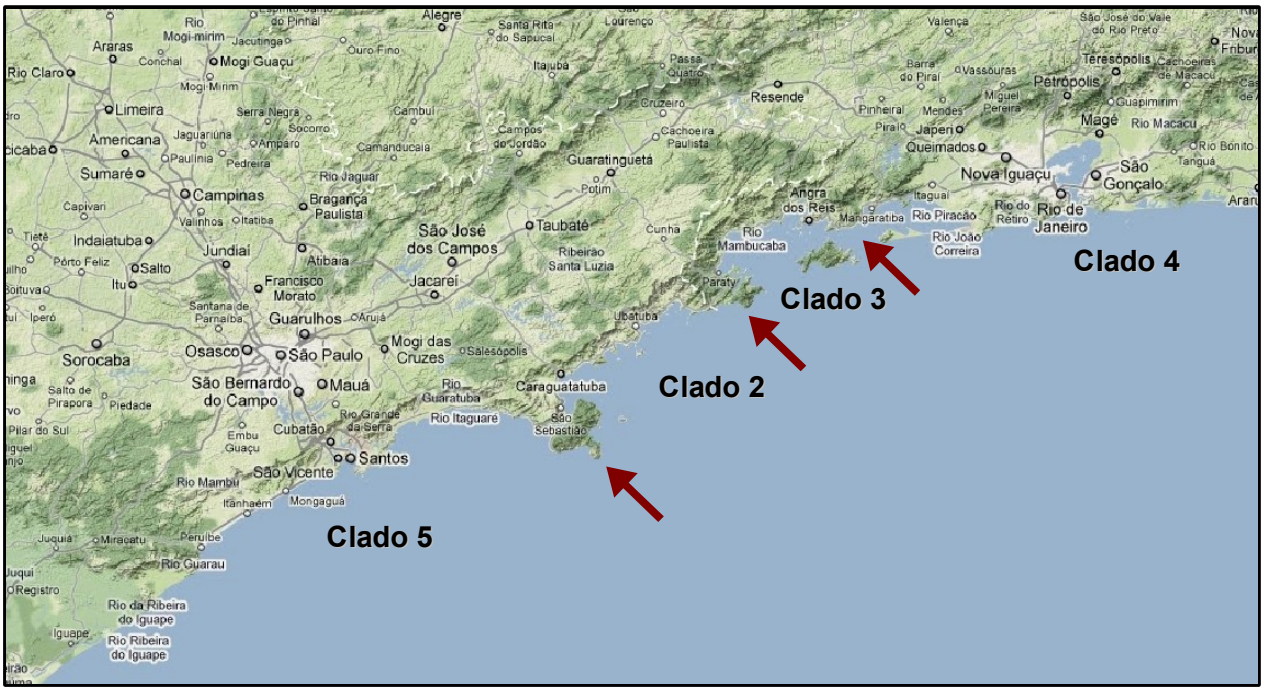

Figura 2.8 – Mapa parcial da região costeira do Brasil, mostrando em detalhe a localização geográfica das linhagens de *Gymnotus pantherinus* recuperadas pelas análises filogenéticas. As setas destacam as áreas da Serra do Mar que podem ter servido como barreiras geográficas durante a diversificação do grupo.

- Capítulo III -

Estudo dos padrões demográficos de Gymnotus pantherinus (Gymnotiformes, Gymnotidae): um modelo de diversificação da ictiofauna em drenagens costeiras do sudeste/sul brasileiro.

RESUMO

As drenagens costeiras do leste e sudeste do Brasil apresentam um alto grau de endemismo em sua composição faunística. Características topográficas e ecológicas dessa região fazem dela uma área de grande significado biogeográfico, entretanto, pouco se sabe a respeito dos eventos cladogenéticos que promoveram tamanha diversificação. No presente trabalho, foram estudadas populações de *Gymnotus pantherinus* endêmicas dos riachos costeiros do litoral brasileiro, com o objetivo de avaliar a diversidade genética do grupo e investigar possíveis rotas de colonização e diversificação. As análises foram feitas com base em marcadores moleculares mitocondriais (Citocromo *b* e Atpase 6/8), em 24 populações amostradas desde o Rio de Janeiro até Santa Catarina. Os resultados revelaram populações altamente estruturadas, apresentando um alto índice de fixação e baixo compartilhamento de haplótipos, sendo reconhecidas três linhagens principais com alta associação geográfica. A maior diversidade genética foi encontrada na região do Vale do Ribeira e clado SP/Sul é o que apresenta a divergência mais recente, a qual pode ter ocorrido após o Último Máximo Glacial (UMG). Populações localizadas a oeste da Serra do Mar (Paraíba do Sul, Alto Tietê e Alto Iguaçu) demonstram maior similaridade com drenagens adjacentes a leste, o que reforça a hipótese de captura de cabeceiras entre drenagens, previamente postulada a partir do compartilhamento de fauna. Sendo

assim, nossos resultados sugerem que o principal componente associado à dispersão e diversificação da ictiofauna costeira seja decorrente da remodelagem das drenagens, como resultado de processos tectônicos recentes, e que as alterações do nível do mar e mudanças climáticas ocorridas durante o UMG possam ter influenciado a expansão demográfica das linhagens mais recentes.

ABSTRACT

Brazilian coastal drainages of the Atlantic Forest present a high degree of endemism in their faunal composition. Although this ecosystem constitutes an area of great biogeographical significance for its topographical and ecological features, little is known about the events that have promoted such species diversification. In the present study, 1345 bp of mitochondrial genes (Cytochrome *b* and ATPase 6/8) of 24 populations of *Gymnotus pantherinus* from Brazilian coastal streams have been analyzed in order to assess their genetic diversity and investigate possible routes of colonization and diversification. Our results disclosed highly structured populations with low number of shared haplotypes and three main phylogenetic lineages with high geographic association. The higher genetic diversity was found in the Ribeira Valley region, while the clade SP/South was the most recently diverged, which may have occurred after the Last Glacial Maximum (LGM). Populations occurring west of the Serra do Mar were more closely related to the adjacent east drainages, which strengthens the hypothesis of headwaters stream capture. In conclusion, these results suggest that the dispersal and diversification of coastal freshwater fishes might be a product of the reshaping of drainages as a consequence of tectonic processes. In addition, fluctuation of the sea level and climatic changes occurred during the LGM might have influenced the demographic expansion of the recently diverged lineages.

INTRODUÇÃO

Populações de *Gymnotus pantherinus* estão distribuídas primariamente pelas drenagens costeiras do leste e sudeste do Brasil, sendo também encontradas em cabeceiras e porções altas de drenagens a oeste da Serra do Mar, como o Alto Tietê, Paraíba do Sul e Iguaçu, constituindo populações relativamente pequenas e de baixa capacidade de dispersão. Pouco ainda se sabe a respeito da ictiofauna da planície costeira da América do Sul, especialmente em relação aos rios e riachos de Mata Atlântica, onde há regiões muito pouco exploradas e que podem conter espécies raras ou ainda não descritas (Serra *et al.*, 2007). Embora seja uma região que se destaca por sua grande variedade de espécies e seu alto grau de endemismo (Menezes *et al.*, 2007; Serra *et al.*, 2007), a inexistência de estudos filogeográficos para as espécies de peixes ocorrentes nessas drenagens torna escasso o conhecimento acerca dos processos demográficos e de diversificação da ictiofauna dos riachos de Mata Atlântica.

Um dos principais objetivos da genética de populações é identificar e quantificar a variação genética que ocorre dentro e entre populações, de modo a elucidar padrões de fluxo gênico, deriva genética, sistemas de acasalamento, mutação e seleção natural. Inferências sobre as forças microevolutivas têm sido usualmente baseadas no número de alelos ou haplótipos, suas freqüências e sua distribuição geográfica (Moysés, 2005). O estudo dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens, especialmente em nível intraespecífico, constitui a base da filogeografia (Avise, 2000). Segundo Avise

(2000), tempo e espaço são conjuntamente os eixos da filogeografia, no qual (idealmente) são mapeadas as genealogias de interesse, delineando os aspectos históricos da distribuição espacial de linhagens gênicas contemporâneas.

Para espécies de peixes de água doce, um alto nível de estruturação genética é esperado, o qual parece apresentar um padrão hierárquico, refletindo a natureza dendrítica dos rios e seu fluxo unidirecional (Ward *et al.*, 1994). Nesse aspecto, espera-se que haja uma maior similaridade genética entre populações dentro de um pequeno rio, ao lado de uma maior diferenciação entre populações de diferentes drenagens (Meffe & Vrijenhoek, 1988), como conseqüência dos níveis de fluxo gênico e da história geomorfológica e/ou climática associada à estruturação genética alcançada pelas populações.

Considerando as características peculiares dos riachos da Mata Atlântica, os quais nascem na Serra do Mar e correm diretamente em direção ao Oceano Atlântico, tendo pouca ou às vezes nenhuma conexão com riachos adjacentes, a história demográfica das populações de *Gymnotus pantherinus* pode fornecer evidências interessantes a respeito da conectividade entre tais riachos e os níveis de fluxo gênico entre eles.

No presente capítulo, foram conduzidas análises populacionais e filogeográficas, em populações de *Gymnotus pantherinus*, com o objetivo de se avaliar os níveis de diversidade genética e de estruturação existentes entre as populações, na tentativa de elucidar os processos demográficos envolvidos na diversificação do grupo e, ainda, contribuir para um melhor entendimento do processo de diversificação da ictiofauna na região Neotropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise populacional, foram amostradas 24 populações de *Gymnotus pantherinus*, distribuídas entre a desembocadura do Rio Paraíba do Sul, ao norte do Estado do Rio de Janeiro, e a cidade de São Francisco do Sul, em Santa Catarina, conforme a delimitação da espécie apresentada no Capítulo 2. A figura 3.1 apresenta o mapa dos pontos de coleta. Para cada população amostrada, foram analisados entre oito e 18 espécimes, totalizando 290 indivíduos, conforme descrito na tabela 3.1.

A extração do DNA total dos exemplares, as reações de amplificação, seqüenciamento e a análise das seqüências foram feitas conforme descrito no capítulo 2. Para as análises populacionais, foram utilizadas seqüências dos genes mitocondriais Citocromo b (citb) e Atpase 6/8 (atp).

A variabilidade genética foi estimada por meio do cálculo dos valores de diversidade haplotípica (Hd; Nei, 1987) e diversidade nucleotídica (π), com o auxílio dos programas Arlequin v. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) e DnaSP v. 5.10 (Librado & Rozas, 2009).

Os valores de divergência das seqüências de nucleotídeos entre pares de haplótipos foram obtidos com o programa Paup v. 4B10 (Swofford, 2001), utilizando a distância *p* (não corrigida). A árvore de haplótipos baseada no método de Parcimônia foi construída pelo programa TNT (Goloboff *et al.*, 2008), utilizando-se o algorítmo de busca heurística com 1000 réplicas. Como grupo externo, foram utilizadas as linhagens da Bahia e do Espírito Santo. O cálculo de *bootstrap* foi feito a partir de 1000 réplicas e plotado sobre a árvore

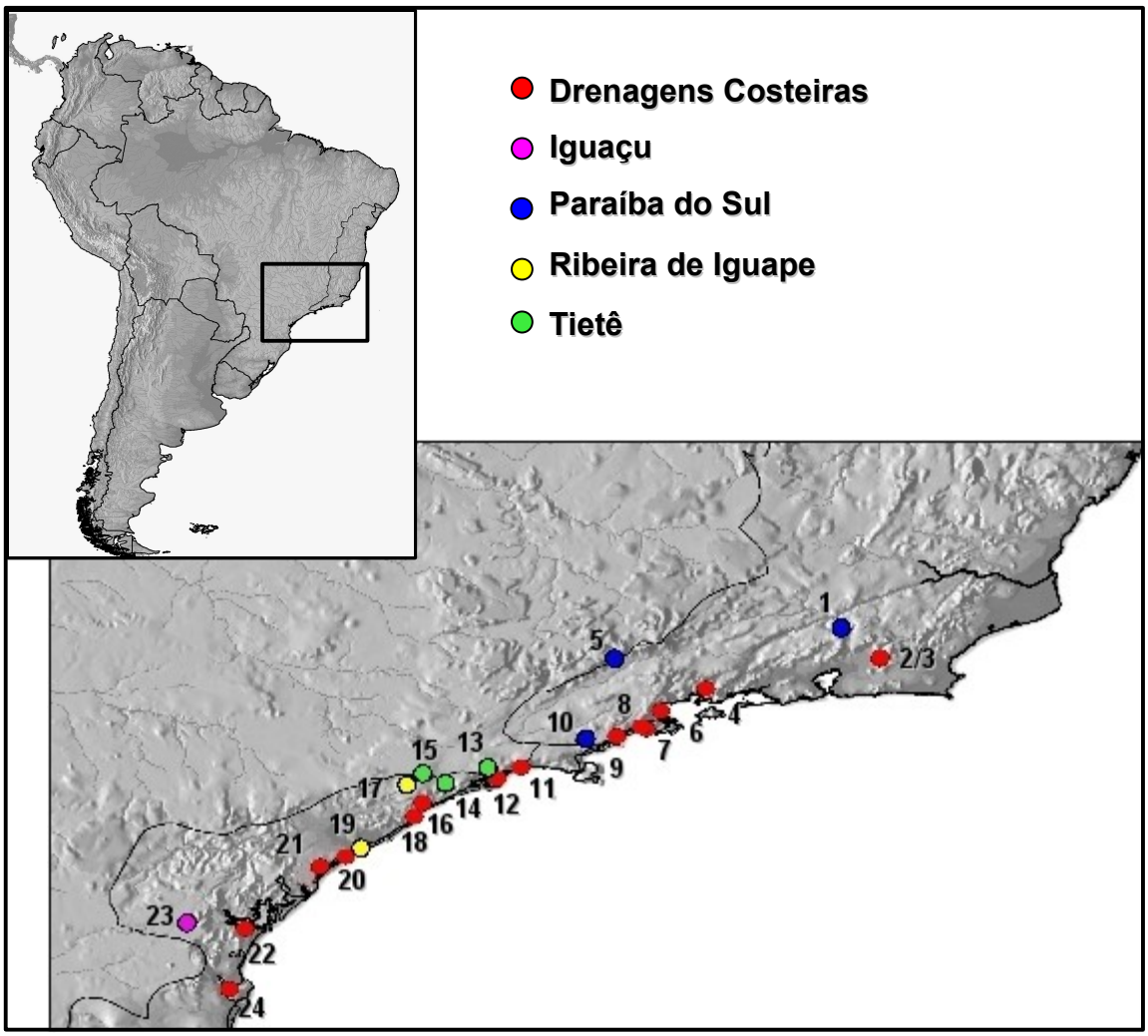

Figura 3.1 - Localidades amostradas para os estudos populacionais: (1) São José do Vale do Rio Preto-RJ; (2 e 3) Cachoeiras do Macacu e Bairro Japuíba-RJ; (4) Angra dos Reis-RJ; (5) Piquete-SP; (6) Paraty-RJ; (7, 8 e 9) Ubatuba-SP, Núcleo Picinguaba e Serra de Taubaté; (10) Natividade da Serra-SP; (11) Bertioga-SP; (12) Santos-SP; (13) Paranapiacaba-SP; (14) Engenheiro Marcilac-SP; (15) São Lourenço da Serra-SP; (16) Itanhaém-SP; (17) Juquitiba-SP; (18) Juréia-SP; (19) Iguape-SP; (20) Subaúma-SP; (21) Cananéia-SP; (22) Paranaguá-PR; (23) Piraquara-PR; e, (24) São Francisco do Sul-SC. As principais regiões hidrográficas são destacadas em cores diferentes.

Tabela 3.1 – Localidades de coleta dos espécimes de *Gymnotus pantherinus* e seus respectivos números amostrais.

Identificação	No. de Indivíduos	Localidade	Região Hidrográfica
ANG	10	Angra dos Reis, RJ	Drenagens costeiras
BER	12	Bertioga, SP	Drenagens costeiras
CAN	10	Cananéia, SP	Drenagens costeiras
EMA	9	Engenheiro Marcilac, SP	Tietê
IGU	9	Iguape, SP	Ribeira de Iguape / drenagens costeiras
ITA	16	Itanhaém, SP	Drenagens costeiras
JAP	16	Cachoeiras do Macacu, Japuíba, RJ	Drenagens costeiras
JUQ	14	Juquitiba, SP	Ribeira de Iguape / drenagens costeiras
JUR	11	Juréia, SP	Drenagens costeiras
MAC	18	Cachoeiras do Macacu, RJ	Drenagens costeiras
NAT	9	Natividade da Serra, SP	Paraíba do Sul
PAG	10	Paranaguá, PR	Drenagens costeiras
PAR	9	Paraty, RJ	Drenagens costeiras
PIC	8	Picinguaba, SP	Drenagens costeiras
PIQ	10	Piquete, SP	Paraíba do Sul
PIR	10	Piraquara, PR	Iguaçu
PRP	9	Paranapiacaba, SP	Tietê
SAN	15	Santos, SP	Drenagens costeiras
SFS	25	São Francisco do Sul, SC	Drenagens costeiras
SJV	10	São José do Vale do Rio Preto, RJ	Paraíba do Sul
SLS	15	São Lourenço da Serra, SP	Tietê
SUB	15	Subaúma, SP	Drenagens costeiras
TAU	11	Ubatuba, SP (Serra de Taubaté)	Drenagens costeiras
UBA	9	Ubatuba, SP	Drenagens costeiras
TOTAL	**290**	**24**	**5**

de consenso estrito resultante da busca heurística previamente conduzida. O índice de decaimento de Bremer (Bremer, 1994) foi calculado a partir de análises subótimas que retinham árvores até 100 passos acima do comprimento total da árvore mais parcimoniosa. As relações entre os haplótipos foram também inferidas a partir da construção de uma rede de haplótipos, sob o critério de *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999) com posterior análise de Parcimônia, implementado no programa *Network* v. 4.5 (*fluxus-engineering.com*, 2009).

A extensão da diferenciação genética entre as populações foi estimada pelo Índice de Fixação (*Fst*) e pelo Teste Exato de Diferenciação entre populações (Raymond & Rousset, 1995; Goudet *et al.*, 1996), com o auxílio do programa Arlequin v. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Testes de estruturação populacional foram feitos pela análise hierárquica da variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992), implementada no programa Arlequin v. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) . Foram avaliados dois tipos de estruturação principais: o agrupamento de populações a oeste *versus* populações a leste da Serra do Mar, a fim de se avaliar a ação da Serra do Mar como barreira geográfica, e o agrupamento de populações em regiões geográficas adjacentes. Como os riachos costeiros, em sua maioria, não são conectados entre si, o teste entre bacias não pode ser aplicado.

Os testes estatísticos de neutralidade foram empregados a fim de se detectar se as mutações observadas no conjunto de dados são seletivamente neutras e/ou indícios de crescimento, declínio ou estabilidade populacional, os quais foram inferidos por meio dos programas Arlequin v. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) e DnaSP v. 5.10 (Librado & Rozas, 2009). Foram inferidos os seguintes

testes: *D*, proposto por Tajima (1989); *D** e *F** (Fu & Li, 1993); e, *Fs* (Fu,1997), o qual é reconhecidamente mais sensível para a dectecção de casos de expansão populacional (Fu, 1997; Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

RESULTADOS

Os genes mitocondriais seqüenciados, citb e atp, foram concatenados resultando em um alinhamento de 1345 pares de bases (pb), sendo 652 e 693 pb correspondentes a cada partição de dados, respectivamente. Foram detectados 79 sítios variáveis (5.8 %), dos quais 51 mostraram-se informativos para parcimônia.

De um modo geral, a composição haplotípica das populações mostrou-se bastante específica, sendo quase todas as populações portadoras de haplótipos exclusivos. No caso de São Francisco do Sul, a especificidade foi tão alta que, na localidade, foram amostrados três riachos e cada um deles apresentou uma constituição haplotípica particular. Por essa razão, para efeito de análise, optou-se por considerar cada riacho como uma população individual (notadas como: SFS-1, SFS-2 e SFS-3).

Foram identificados 60 haplótipos, dos quais apenas oito são compartilhados por pelo menos duas populações, sendo os 52 haplótipos restantes, exclusivos. Como mostra a figura 3.2, verificou-se que oito das populações amostradas apresentam uma composição haplotípica específica, não compartilhando haplótipos com nenhuma outra (são elas: Cachoeiras do

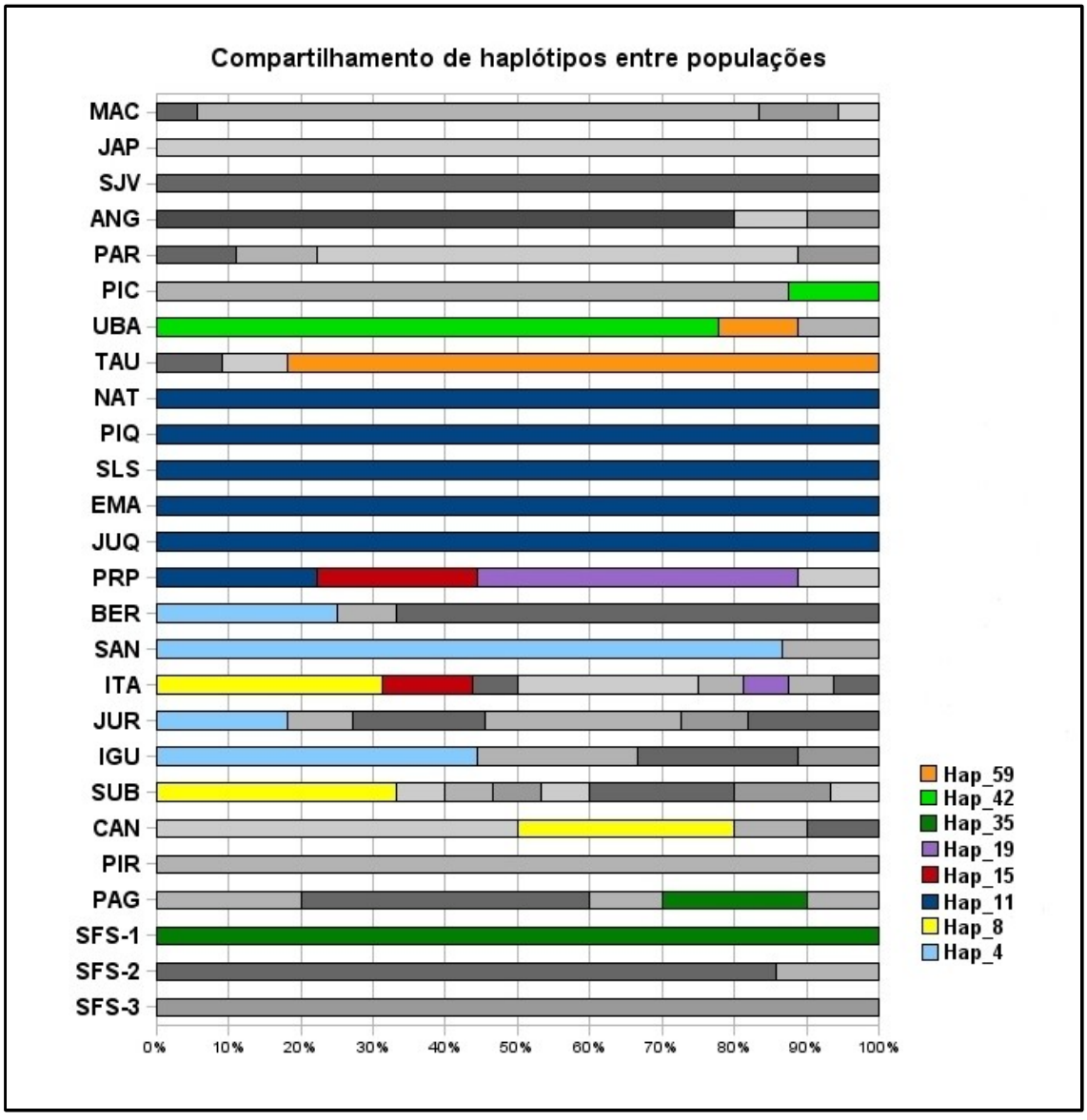

Figura 3.2 – Compartilhamento de haplótipos entre as populações de *Gymnotus pantherinus*. Os haplótipos exclusivos de cada população são representados em cinza; os haplótipos compartilhados estão representados por cores.

Macacu-RJ, Japuíba-RJ, São José do Vale do Rio Preto-RJ, Angra-RJ, Paraty-RJ, Piraquara-PR e São Francisco do Sul-SC 2 e 3). As demais populações, compartilham pelo menos um haplótipo com localidades próximas.

As populações de Subaúma-SP e Itanhaém-SP foram as que apresentaram o maior número de haplótipos, com oito haplótipos cada, seguidas das populações de Bertioga-SP e Juréia-SP (6) e Paranaguá-PR (5). Por outro lado, várias populações mostraram-se monomórficas, estando representadas por um único haplótipo mitocondrial, como é o caso de: Engenheiro Marcilac-SP, Juquitiba-SP, Natividade da Serra-SP, Piquete-SP e São Lourenço da Serra-SP, as quais compartilham o mesmo haplótipo (hap_11); e, Japuíba-RJ, Piraquara-PR e São José do Vale do Rio Preto-RJ, as quais apresentam haplótipos exclusivos.

Em relação aos índices de diversidade, a maior diversidade haplotípica foi encontrada para as populações de Juréia-SP, Subaúma-SP, Itanhaém-SP e Paranaguá-PR (>0.80), além das populações de Iguape-SP, Paranapiacaba-SP e Cananéia-SP (0.77, 0.77 e 0.71, respectivamente). Já em relação à diversidade nucleotídica, as populações que apresentaram valores mais altos foram Iguape-SP, Cananéia-SP, Itanhaém-SP e Paranapiacaba-SP (0.0034, 0.0034, 0.0032 e 0.0028, respectivamente). Um sumário da diversidade genética encontrada para as populações de *Gymnotus pantherinus* é apresentado na tabela 3.2.

A divergência das seqüências entre pares de haplótipos variou de 0.07% (entre seqüências que diferem entre si por apenas 1 nucleotídeo) a 2.16% (para as que diferem entre si por 29 nucleotídeos) (Anexo 5). Dada a baixa divergência entre os haplótipos, a relação filogenética entre eles foi inferida sob o critério de Parcimônia. Foram obtidas 18 árvores mais parcimoniosas, com

comprimento de ramos de 158 passos mutacionais, das quais foi gerado o consenso estrito representado na figura 3.3.

Tabela 3.2 – Sumário da diversidade genética estimada para as populações de *Gymnotus pantherinus*.

População	#	Haplótipos	Sítios Polimórficos	Diversidade Haplotípica (Hd)	Diversidade Nucleotídica (π)
ANG	10	3	3	0.37778	0.00045
BER	12	3	6	0.53030	0.00165
CAN	10	4	9	0.71111	0.00337
EMA	9	1	0	0.00000	0.00000
IGU	9	4	12	0.77778	0.00336
ITA	16	8	17	0.85833	0.00321
JAP	16	1	0	0.00000	0.00000
JUQ	14	1	0	0.00000	0.00000
JUR	11	6	6	0.89091	0.00146
MAC	18	4	14	0.39869	0.00196
NAT	9	1	0	0.00000	0.00000
PAG	10	5	7	0.82222	0.00165
PAR	9	4	4	0.58333	0.00079
PIC	8	2	1	0.25000	0.00019
PIQ	10	1	0	0.00000	0.00000
PIR	10	1	0	0.00000	0.00000
PRP	9	4	10	0.77778	0.00286
SAN	15	2	1	0.24762	0.00018
SFS-1	10	1	0	0.00000	0.00000
SFS-2	7	2	1	0.28571	0.00021
SFS-3	8	1	0	0.00000	0.00000
SJV	10	1	0	0.00000	0.00000
SLS	15	1	0	0.00000	0.00000
SUB	15	8	9	0.86667	0.00153
TAU	11	3	5	0.34455	0.00089
UBA	9	3	3	0.41667	0.00062
TOTAL*	290	60	79**	0.93683	0.00971

* valor correspondente a análise total e não a somatória das análises parciais
** mutações = 82

A análise filogenética dos haplótipos recupera três clados principais, os quais são definidos geograficamente: Clado RJ (inclui os haplótipos amostrados das populações do estado do Rio de Janeiro, tanto a leste quanto a oeste da

Serra do Mar), Clado Norte de São Paulo (inclui haplótipos amostrados nas populações do litoral norte do estado de São Paulo, região de Ubatuba), e Clado SP/Sul (o qual inclui todos os haplótipos pertencentes às populações litorâneas desde Bertioga-SP até São Francisco do Sul-SC, além dos haplótipos amostrados a oeste da Serra do Mar em São Paulo e Paraná). Tais clados são recuperados com alto valor de suporte (*bootstrap* = 77, 99 e 99; BS= 4, 10 e 10, respectivamente).

A relação entre os haplótipos inferida a partir da rede de haplótipos (figura 3.4) novamente revela a existência dos três clados principais, definidos anteriormente. O Clado RJ aparece mais proximamente relacionado com o Clado Norte de SP, os quais divergem entre si por pelo menos oito substituições de nucleotídeos. Já a divergência entre o ancentral provável para estes dois grupos e o Clado SP/Sul é de ao menos 10 substituições.

Valores significativos de *Fst* foram encontrados na maioria das comparações entre pares de populações (tabela 3.3). Valores não significativos foram registados na comparação entre as populações: do grupo Engenheiro Marcilac-SP, Juquitiba-SP, Natividade da Serra-SP, Piquete-SP e São Lourenço da Serra-SP, as quais compartilham um único haplótipo (*Fst* = 0); Iguape-SP x Jureia-SP (*Fst* = 0.091); e, Itanhaém-SP x Subaúma-SP (*Fst* = 0.037). Já pelo Teste Exato de Diferenciação entre populações, o qual avalia a distribuição aleatória dos diferentes haplótipos entre as populações com base nas freqüências haplotípicas, apontou diferenciação significativa para todos os pares de populações, com exceção apenas nas comparações dentro do grupo

Engenheiro Marcilac-SP, Juquitiba-SP, Natividade da Serra-SP, Piquete-SP e São Lourenço da Serra-SP, apontando a existência de 20 grupos diferenciados.

A análise da variância molecular (AMOVA) (tabela 3.4), quando inferida a partir dos grupos formados pelos clados principais (3 grupos), revelou que uma proporção estatisticamente significativa da variância molecular pode ser atribuída a diferenças entre os grupos/clados (73.87%), embora uma parcela ainda alta dessa variância seja atribuída à diferenciação entre populações dentro de cada grupo (20.02%), demonstrando a existência de grupos estruturados dentro de cada clado (Fsc = 0.7661). A segunda hipótese de agrupamento testada a partir de dois grupos, resulta em uma porcentagem de variância entre os grupos (14.34%) menor do que a variância observada entre populações dentro de cada grupo (76.68%), sendo tal estruturação não suportada estatisticamente. Novamente, os índices de fixação demonstram a existência de grupos estruturados dentro de cada agrupamento (*Fsc* = 0.8951).

Os testes de neutralidade de Tajima (*D*) e Fu & Li (*D** e *F**) aplicados para cada uma das populações separadamente e para todo o conjunto de dados (tabela 3.5) resultaram em valores estatisticamente não significativos, com exceção apenas dos índices *D** e *F** para a população de Cananéia-SP, que apresentou valores estatisticamente significativos e maiores que zero (positivos), sugerindo um evento de gargalo populacional para essa localidade. Já o teste *Fs* (Fu), apresentou-se significativamente negativo apenas para a população de Subaúma-SP, sugerindo um processo de expansão demográfica recente para essa população.

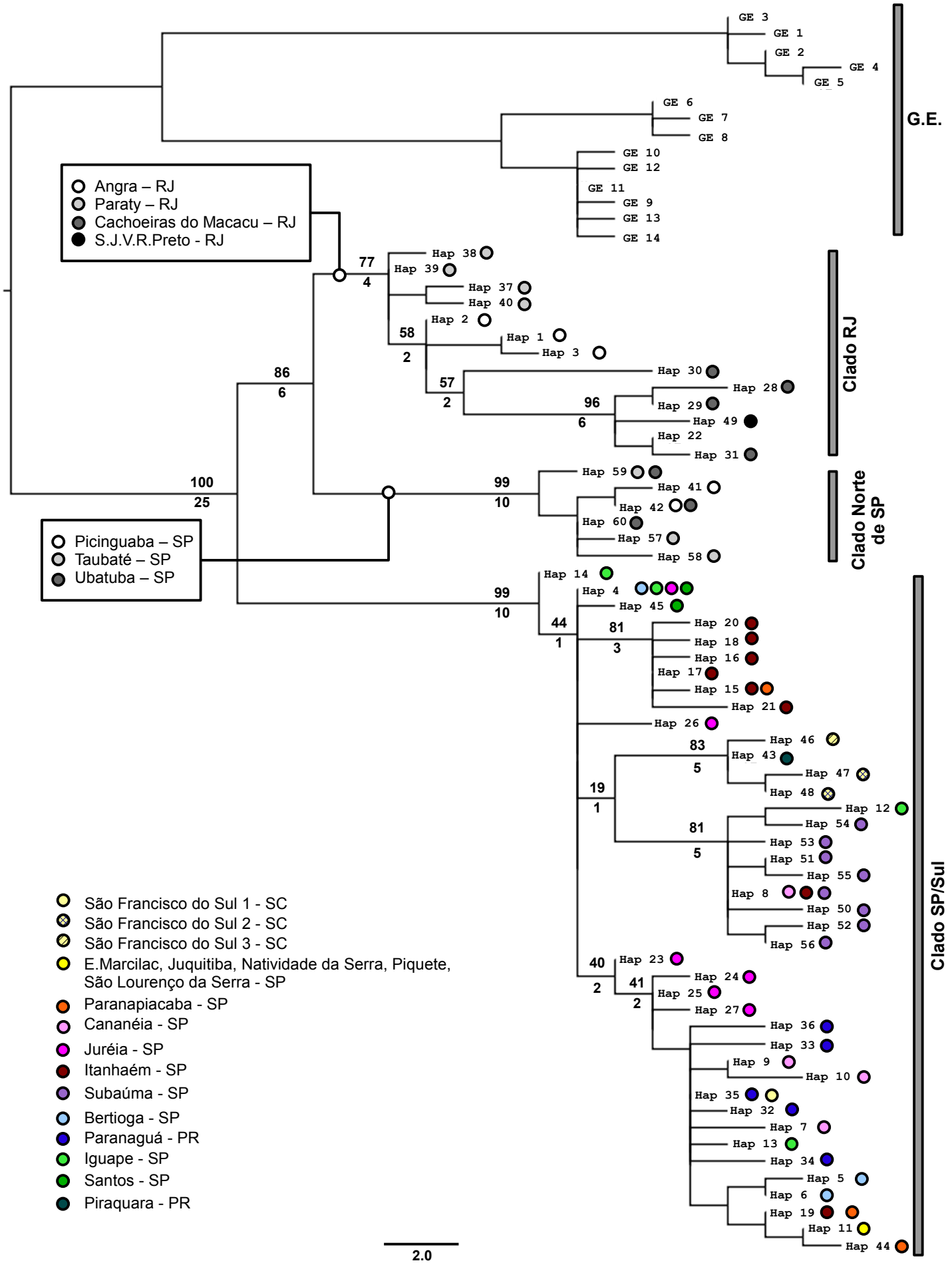

Figura 3.3 – Árvore de consenso estrito sob o critério de Parcimônia, mostrando a relação entre os 60 haplótipos amostrados. Os valores de *Bootstrap* são indicados acima dos ramos e abaixo, os índices de suporte de Bremer.

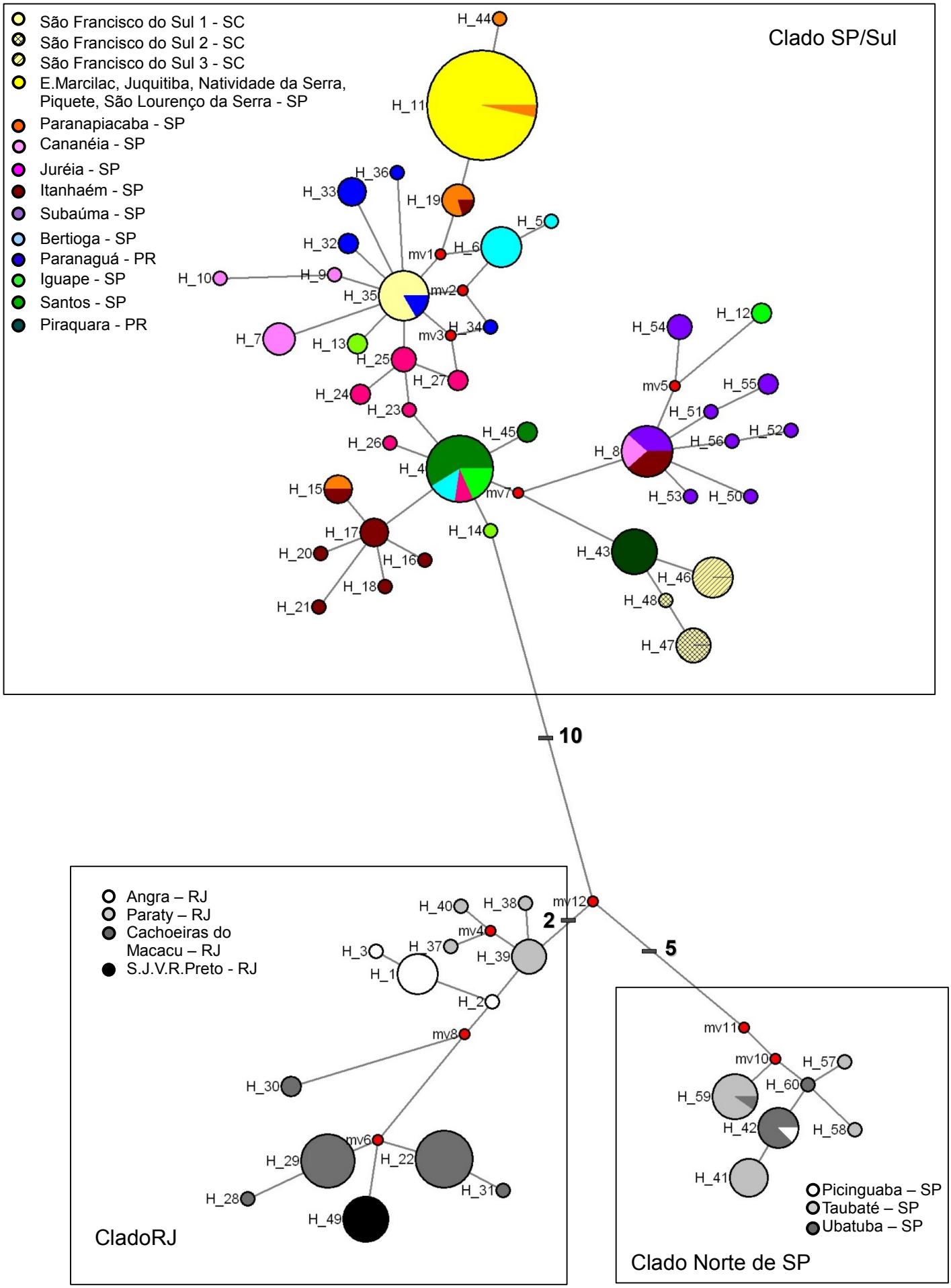

Figura 3.4 – Rede de haplótipos mitocondriais de *Gymnotus pantherinus*. Três clados principais são recuperados, os quais apresentam clara associação geográfica.

Tabela 3.3 - Índice de Fixação entre pares de populações (diagonal inferior) e seus respectivos valores de significância (*p-value,* diagonal superior). Em vermelho, destaca-se os pares de populações que não demonstram estruturação. Os asteriscos vermelhos mostram os pares de populações que não mostraram diferenciação significativa pelo Teste Exato de Diferenciação.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	ANG	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00098+-0.0010	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
2	BER	0.541	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00586+-0.0026	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
3	CAN	0.456	0.384	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.02051+-0.0053	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
4	EMA	0.802	0.703	0.630	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	**0.99902+-0.0002**	0.00000+-0.0000
5	IGU	0.429	0.273	0.256	0.611	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.04395+-0.0064
6	ITA	0.355	0.296	0.129	0.495	0.178	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00391+-0.0019
7	JAP	0.852	0.767	0.712	1.000	0.700	0.571	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
8	JUQ	0.841	0.752	0.692	**0.000***	0.679	0.552	1.000	*	0.00000+-0.0000
9	JUR	0.359	0.259	0.197	0.524	**0.091**	0.126	0.614	0.593	*
10	MAC	0.610	0.544	0.472	0.744	0.448	0.378	0.791	0.779	0.385
11	NAT	0.802	0.703	0.630	**0.000***	0.611	0.495	1.000	**0.000***	0.524
12	PAG	0.400	0.330	0.233	0.573	0.200	0.158	0.662	0.641	0.143
13	PAR	0.523	0.445	0.351	0.708	0.319	0.263	0.781	0.764	0.256
14	PIC	0.680	0.589	0.502	0.883	0.476	0.391	0.917	0.910	0.400
15	PIQ	0.811	0.715	0.644	**0.000***	0.627	0.508	1.000	**0.000***	0.540
16	PIR	0.811	0.715	0.644	1.000	0.627	0.508	1.000	1.000	0.540
17	PRP	0.429	0.355	0.256	0.500	0.222	0.130	0.700	0.578	0.164
18	SAN	0.698	0.516	0.552	0.847	0.206	0.442	0.880	0.872	0.353
19	SFS-3	0.791	0.691	0.614	1.000	0.593	0.481	1.000	1.000	0.507
20	SFS-2	0.661	0.568	0.476	0.876	0.448	0.368	0.914	0.906	0.373
21	SFS-1	0.811	0.715	0.644	1.000	0.627	0.508	1.000	1.000	0.540
22	SJV	0.811	0.715	0.644	1.000	0.627	0.508	1.000	1.000	0.540
23	SLS	0.847	0.760	0.702	**0.000***	0.690	0.562	1.000	**0.000***	0.604
24	SUB	0.354	0.294	0.119	0.498	0.174	**0.037**	0.576	0.557	0.122
25	TAU	0.639	0.559	0.477	0.811	0.452	0.374	0.858	0.847	0.382
26	UBA	0.604	0.521	0.431	0.792	0.403	0.333	0.847	0.834	0.334

Tabela 3.3 - Índice de Fixação entre pares de populações (diagonal inferior) e seus respectivos valores de significância (*p-value,* diagonal superior). Em vermelho, destaca-se os pares de populações que não demonstram estruturação. Os asteriscos vermelhos mostram os pares de populações que não mostraram diferenciação significativa pelo Teste Exato de Diferenciação.

		10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	ANG	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
2	BER	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
3	CAN	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
4	EMA	0.00000+-0.0000	**0.99902+-0.0002**	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	**0.99902+-0.0002**	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
5	IGU	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00098+-0.0010	0.00098+-0.0010	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.01074+-0.0026
6	ITA	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00879+-0.0025	0.00000+-0.0000
7	JAP	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
8	JUQ	0.00000+-0.0000	**0.99902+-0.0002**	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	**0.99902+-0.0002**	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
9	JUR	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
10	MAC	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
11	NAT	0.744	*	0.00098+-0.0010	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	**0.99902+-0.0002**	0.00000+-0.0000	0.00195+-0.0014	0.00000+-0.0000
12	PAG	0.423	0.573	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
13	PAR	0.529	0.708	0.294	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
14	PIC	0.654	0.883	0.444	0.576	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
15	PIQ	0.752	**0.000***	0.589	0.722	0.889	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
16	PIR	0.752	1.000	0.589	0.722	0.889	1.000	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
17	PRP	0.448	0.500	0.200	0.319	0.476	0.518	0.627	*	0.00000+-0.0000
18	SAN	0.672	0.847	0.501	0.616	0.752	0.853	0.853	0.532	*
19	SFS-3	0.736	1.000	0.555	0.694	0.875	1.000	1.000	0.593	0.840
20	SFS-2	0.639	0.876	0.417	0.551	0.733	0.883	0.883	0.448	0.739
21	SFS-1	0.752	1.000	0.486	0.722	0.889	1.000	1.000	0.627	0.853
22	SJV	0.752	1.000	0.589	0.722	0.889	1.000	1.000	0.627	0.853
23	SLS	0.785	**0.000***	0.652	0.773	0.914	**0.000***	1.000	0.590	0.876
24	SUB	0.378	0.498	0.154	0.260	0.390	0.511	0.511	0.174	0.443
25	TAU	0.623	0.811	0.423	0.544	0.696	0.820	0.820	0.452	0.710
26	UBA	0.594	0.792	0.375	0.500	0.626	0.802	0.802	0.403	0.685

Tabela 3.3 - Índice de Fixação entre pares de populações (diagonal inferior) e seus respectivos valores de significância (*p-value,* diagonal superior). Em vermelho, destaca-se os pares de populações que não demonstram estruturação. Os asteriscos vermelhos mostram os pares de populações que não mostraram diferenciação significativa pelo Teste Exato de Diferenciação.

		19	20	21	22	23	24	25	26
1	ANG	0.00098+-0.0010	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
2	BER	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
3	CAN	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.02539+-0.0045	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
4	EMA	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	**0.99902+-0.0002**	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
5	IGU	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
6	ITA	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	**0.10059+-0.0085**	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
7	JAP	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
8	JUQ	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	**0.99902+-0.0002**	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
9	JUR	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
10	MAC	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
11	NAT	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	**0.99902+-0.0002**	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
12	PAG	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00098+-0.0010	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00098+-0.0010	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
13	PAR	0.00000+-0.0000	0.00195+-0.0014	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
14	PIC	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00195+-0.0014
15	PIQ	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	**0.99902+-0.0002**	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
16	PIR	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
17	PRP	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00098+-0.0010	0.00000+-0.0000
18	SAN	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
19	SFS-3	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00098+-0.0010
20	SFS-2	0.867	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
21	SFS-1	1.000	0.883	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
22	SJV	1.000	0.883	1.000	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
23	SLS	1.000	0.910	1.000	1.000	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
24	SUB	0.483	0.367	0.511	0.511	0.567	*	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
25	TAU	0.802	0.679	0.820	0.820	0.852	0.374	*	0.00000+-0.0000
26	UBA	0.780	0.642	0.802	0.802	0.841	0.331	0.584	*

Tabela 3.4 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre os haplótipos mitocondriais de *Gymnotus pantherinus*.

Componentes da Variância	3 grupos			2 grupos		
	% do Total	*p* *	Índices	% do Total	*p* *	Índices
Entre grupos	73.87	0.0000	*Fct* = 0.7387	14.34	0.0000	*Fct* = 0.1436
Entre populações do mesmo grupo	20.02	0.0000	*Fsc* = 0.7661	76.68	0.0000	*Fsc* = 0.8951
Dentro das populações	6.11	0.0000	*Fst* = 0.9389	8.98	**0.0531**	*Fst* = 0.9101

* 10100 permutações

Tabela 3.5 – Resultado dos testes de Neutralidade e seus respectivos valores de significância.

	D (Tajima)		D* (Fu & Li)		F* (Fu & Li)		Fs (Fu)	
ANG	-1.5622	0.05>p>0.10	-1.7844	p > 0.10	-1.9338	p > 0.10	-0.4586	p > 0.10
BER	0.4324	p > 0.10	0.7061	p > 0.10	0.7210	p > 0.10	2.5955	p > 0.10
CAN	1.8302	p > 0.10	**1.4351**	**p <0.05**	**1.7228**	**p <0.02**	2.6716	p > 0.10
EMA	-	-	-	-	-	-	-	-
IGU	0.0910	p > 0.10	1.2006	p > 0.10	1.0437	p > 0.10	2.3195	p > 0.10
ITA	-0.6243	p > 0.10	-1.2727	p > 0.10	-1.2583	p > 0.10	-0.3869	p > 0.10
JAP	-	-	-	-	-	-	-	-
JUQ	-	-	-	-	-	-	-	-
JUR	-0.1640	p > 0.10	0.1491	p > 0.10	0.0796	p > 0.10	-1.6065	0.05>p>0.10
MAC	-1.3399	0.05>p>0.10	0.1076	p > 0.10	-0.3521	p > 0.10	2.4593	p > 0.10
NAT	-	-	-	-	-	-	-	-
PAG	-0.4317	p > 0.10	-0.6288	p > 0.10	-0.6515	p > 0.10	-0.3626	p > 0.10
PAR	-1.1494	p > 0.10	-1.0315	p > 0.10	-1.1769	p > 0.10	-0.9275	p > 0.10
PIC	-1.0548	p > 0.10	-1.1264	p > 0.10	-1.2035	p > 0.10	-0.1820	p > 0.10
PIQ	-	-	-	-	-	-	-	-
PIR	-	-	-	-	-	-	-	-
PRP	0.1948	p > 0.10	1.1179	p > 0.10	1.0009	p > 0.10	1.8949	p > 0.10
SAN	-0.3988	p > 0.10	0.7010	p > 0.10	0.4775	p > 0.10	0.1334	p > 0.10
SFS-1	-	-	-	-	-	-	-	-
SFS-2	-1.0062	p > 0.10	-1.0488	p > 0.10	-1.1015	p > 0.10	-0.0947	p > 0.10
SFS-3	-	-	-	-	-	-	-	-
SJV	-	-	-	-	-	-	-	-
SLS	-	-	-	-	-	-	-	-
SUB	-0.9629	p > 0.10	-0.4855	p > 0.10	-0.7049	p > 0.10	**-2.9759**	**p <0.02**
TAU	-1.1381	p > 0.10	-0.7638	p > 0.10	-0.9666	p > 0.10	0.9596	p > 0.10
UBA	-0.9361	p > 0.10	-0.7256	p > 0.10	-0.8597	p > 0.10	0.0164	p > 0.10
TOTAL	-0.0161	p > 0.10	0.0360	p > 0.10	0.0135	p > 0.10	-7.3004	p > 0.10

DISCUSSÃO

Sobre a diversidade genética

O padrão recuperado a partir dos valores de diversidade genética, independentemente de sua magnitude, nos permite inferir os processos demográficos que atuaram sobre as populações (Grant & Bowen, 1998). Para as populações de *Gymnotus pantherinus*, observa-se que os valores de diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica apresentam uma certa correlação entre populações que apresentam valores mais elevados para ambas as medidas de diversidade. É o caso das populações de Cananéia-SP, Iguape-SP e Itanhaém-SP. Já as populações de Juréia-SP, Subaúma-SP e Paranaguá-PR apresentam valores altos de diversidade haplotípica, embora apresentem valores baixos de diversidade nucleotídica.

No primeiro caso, a existência de alta diversidade nucleotídica associada à alta diversidade haplotípica, decorre da existência de muitos haplótipos na população, os quais diferem substancialmente entre si. Esse padrão pode ser decorrente de estabilidade populacional estabelecida a longo prazo, ou ainda, do contato secundário entre linhagens previamente divergentes. No segundo caso, a existência de muitos haplótipos que diferem entre si por poucas mutações, é atribuída a expansão populacional após período de tamanho efetivo populacional reduzido, de modo que o rápido crescimento populacional garante a retenção de mutações novas (Grant & Bowen, 1998).

Por outro lado, segundo Grant & Browen (1998), para populações que apresentam baixa diversidade, é difícil distinguir entre os processos de recente colonização (causada por um efeito fundador) ou flutuações do tamanho populacional, causando reduções drásticas do tamanho efetivo da população (efeito gargalo), porque os efeitos de ambos os processos sobre a diversidade genética são idênticos. Esse padrão de baixa diversidade foi encontrado em maior escala para as populações de *Gymnotus pantherinus*. Nesse aspecto, podemos ainda dividir o padrão de baixa diversidade em dois grupos distintos. O primeiro grupo é constituído por populações nas quais a diversidade é nula, dada a sua constituição haplotípica monomórfica (sendo elas: Japuíba-RJ, São José do Vale do Rio Preto-RJ, Engenheiro Marcilac-SP, Juquitiba-SP, Natividade da Serra-SP, Piquete-SP, São Lourenço da Serra-SP, Piraquara-PR e São Francisco do Sul-SC, riachos 1 e 3). O segundo grupo é composto por populações com baixo número de haplótipos, os quais diferem entre si por poucas mutações, compreendendo as populações de Angra dos Reis-RJ, Cachoeiras do Macacu-RJ, Picinguaba-SP, Ubatuba-SP, Serra de Taubaté-SP, Santos-SP e São Francisco do Sul-SC, riacho 2.

Evidentemente, as inferências demográficas feitas a partir dos valores de diversidade genética são arbitrárias no que se refere ao estabelecimento dos limites dos valores, de certa forma um tanto quanto subjetivos. Apesar disso, o padrão evidenciado pelos índices de diversidade pode nos oferecer cenários distintos entre as populações, que devem ser investigados e corroborados por testes mais robustos.

Outro aspecto interessante evidenciado a partir dos índices de diversidade genética é que a maioria das populações que apresentam os valores mais altos de diversidade estão associadas ao Vale do Ribeira de Iguape (SP). É o caso de Cananéia-SP, Iguape-SP e Subaúma-SP. Observando-se a geografia do vale, nota-se que nessa região, a planície costeira assume sua porção mais extensa no sentido leste-oeste, em comparação com todo o restante da região costeira. Os rios de planície, por sua vez, apresentam uma certa mobilidade em seu curso, tanto por serem influenciados de forma mais intensa pela variação do nível das águas (sendo mais suscetíveis a cheias e/ou transbordamentos em função do regime pluvial) ou simplesmente pelo processo erosivo característico de planície (A. Ribeiro, comunicação pessoal, 2010). Esse padrão das drenagens pode favorecer o estabelecimento de populações maiores (seja em números absolutos ou em relação ao efetivo populacional), já que os peixes tendem a se deslocar juntamente com o rio, o que diretamente influencia a dinâmica da população. Nesse aspecto, o padrão inverso é também congruente com nossas observações: as populações que apresentaram os níveis mais baixos de diversidade são alocadas em regiões mais elevadas, onde os rios são encaixados em recortes da porção serrana, de modo que o processo erosivo tende a escavar sempre na mesma calha, sem provocar grandes alterações nos cursos dos riachos. Esse padrão geomorfológico tende a favorecer o estabelecimento de populações menores que, associadas à baixa vagilidade da espécie, podem ter a sua diversidade reduzida por efeito de deriva genética mais intensa.

A única população que difere desse padrão está localizada em Paranapiacaba-SP, pertencendo a porção Alta das cabeceiras do Tietê, mas que

também apresenta valores relativamente altos de diversidade. No caso dessa localidade, nossa hipótese é a de que essa população possa estar envolvida no translocamento de fauna entre cabeceiras de drenagens adjacentes, o que será discutido posteriormente, por compartilhar haplótipos com drenagens de ambos os lados da Serra do Mar. Nesse aspecto, contatos secundários poderiam ser responsáveis pelos valores de diversidade observados nessa localidade.

Estrutura populacional e padrões demográficos

Populações biológicas são freqüentemente encontradas estruturadas em decorrência de diversos fatores, tais como geográficos ou ecológicos, que geram hábitats descontínuos, ou ainda comportamentais. Quando as populações são subdividas, a identidade genética entre elas pode diferir, influenciada pelos níveis de fluxo gênico mantido entre as partes. Quando o fluxo gênico se mantém alto, desempenha um papel homogeneizador da variação genética sobre os grupos, entretanto, quando é baixo ou ausente, fatores evolutivos tais como deriva genética, seleção e até mesmo mutação, ocorrendo nos grupos independentemente, podem conduzir à diferenciação genética (Hedrick, 2005).

O efeito do fluxo gênico é manter similar a freqüência alélica nas diferentes populações. Por outro lado, populações que divergiram recentemente freqüentemente compartilham variação genética, não necessariamente resultante de fluxo gênico, mas sim, decorrente da retenção de polimorfismos

ancestrais pela persistência da variação em ambas as populações, desde o ancestral comum compartilhado. A determinação de cada um desses processos, entretanto, nem sempre é uma tarefa fácil. O uso de marcadores genéticos como medidas indiretas de fluxo gênico tem sido útil, a partir de medidas de estrutura populacional como *Fst* ou índices relacionados (Excoffier, 2001) ou ainda, de medidas baseadas em métodos de análises coalescentes (Beerli & Felsenstein, 2001).

Apesar de muitas críticas em relação ao uso do *Fst* como estimativa de fluxo gênico (e.g., Whitlock & Mccauley,1999; Neigel, 2002), seu uso como ferramenta de análise da estruturação entre populações é indiscutível. Para inferências de fluxo gênico, as novas abordagens coalescentes têm se mostrado superiores àquelas baseadas em *Fst*, além de serem aplicáveis em condições em que o *Fst* não se aplica, dadas as premissas do modelo (Neigel, 2002). Dessa forma, o *Fst* nos oferece uma excelente medida da diferenciação genética entre populações, embora não seja adequada sua interpretação como medida de *Nm* (número de migrantes) (Whitlock & Mccauley,1999).

Para *Gymnotus pantherinus*, observou-se um baixo compartilhamento de haplótipos entre as populações, já que dos 60 haplótipos identificados apenas oito são compartilhados por pelo menos um par de populações (figura 3.2). Ainda assim, a freqüência dos haplótipos compartilhados difere substancialmente entre as populações. Associado ao fato de que quase todas as populações são portadores de haplótipos exclusivos, esse padrão sugere que o compartilhamento de haplótipos nesse caso possa ser preferencialmente decorrente da retenção de polimorfismos ancestrais. Exceção a esse cenário foi

encontrada para o grupo Engenheiro Marcilac-SP, Juquitiba-SP, Natividade da Serra-SP, Piquete-SP e São Lourenço da Serra-SP, que compartilha o mesmo único haplótipo (hap_11), fato que pode estar associado a um efeito fundador durante a colonização das localidades em questão.

A constituição haplotípica das populações de *Gymnotus pantherinus* gera índices altamente significativos de estruturação baseado nos valores de *Fst*. Todas as comparações de populações aos pares mostraram valores de *Fst* significativos de estruturação genética, com exceção apenas do grupo Engenheiro Marcilac-SP, Juquitiba-SP, Natividade da Serra-SP, Piquete-SP e São Lourenço da Serra-SP e na comparação entre os seguintes pares de populações: Jureia-SP x Iguape-SP; e, Itanhaém-SP x Subaúma-SP. Já o Teste Exato de Diferenciação não se mostrou significativo somente para o primeiro grupo (tabela 3.3).

Dessa forma, os resultados demonstram que as populações de *Gymnotus pantherinus* encontram-se altamente estruturadas. Em alguns casos, a diferenciação é tão grande, que populações geograficamente muito próximas exibem constituições haplotípicas notadamente distintas e divergentes, demonstrando isolamento completo e, conseqüentemente, ausência de fluxo gênico. É o caso das populações amostradas em São Francisco do Sul-SC. Nessa localidade, foram amostrados três riachos diferentes para se atingir um número amostral razoável, já que os riachos eram pequenos e de difícil acesso, sendo em média amostrados 10 indivíduos em cada um deles. O riacho 1 (SFS-1) apresentou apenas um haplótipo, o qual foi também amostrado em Paranaguá-PR. Entretanto, esse haplótipo difere dos haplótipos amostrados nos riachos 2 e

3 (SFS-2 e SFS-3) por pelo menos sete mutações, os quais também apresentaram uma constituição haplotípica particular. O interessante é notar que tais riachos estão separados por no máximo 3.5 km de distância (tabela 3.6; figura 3.5). Analisando a rede de haplótipos apresentada na figura 3.4, verifica-se que os haplótipos amostrados no riacho 1 são mais proximamente relacionados aos haplótipos amostrados em Paranaguá-PR, Cananéia-SP, Iguape-SP e Juréia-SP, enquanto os haplótipos amostrados nos riachos 2 e 3 são mais próximos do haplótipo amostrado em Piraquara-PR, sugerindo que tais riachos possam ter sido colonizados por linhagens distintas, apesar da proximidade geográfica entre eles.

Tabela 3.6 – Comparação entre distância geográfica e distância genética entre as populações da região Sul do Brasil.

		Distância (Km)	Distância p
Paranaguá, PR	**Piraquara, PR**	54.0	0.0061
Paranaguá, PR	**SFS-1, SC**	75.7	0.0010
Paranaguá, PR	**SFS-2, SC**	73.8	0.0075
Paranaguá, PR	**SFS-3, SC**	73.1	0.0054
Piraquara, PR	**SFS-1, SC**	90.8	0.0052
Piraquara, PR	**SFS-2, SC**	88.4	0.0014
Piraquara, PR	**SFS-3, SC**	87.4	0.0007
SFS-1, SC	**SFS-2, SC**	2.47	0.0066
SFS-1, SC	**SFS-3, SC**	3.53	0.0045
SFS-2, SC	**SFS-3, SC**	1.06	0.0021

Padrão semelhante é visto em relação a Cachoeiras do Macacu-RJ e Japuíba-RJ, riachos que distam 3.1 km entre si, mas também apresentam constituições haplotípicas distintas, sugestivas da ausência de fluxo gênico

entre tais populações. Nesse caso porém, a divergência entre os haplótipos é pequena (uma mutação entre os haplótipos mais próximos). Outro exemplo é visto por Ubatuba-SP x Núcleo Picinguaba-SP, onde a distância entre os pontos amostrados é de 5.4 km. Nesse caso, há o compartilhamento de um haplótipo entre as localidades, porém em freqüências distintas, além da presença de haplótipos exclusivos em ambas as populações.

Os resultados de AMOVA corroboram a alta estruturação previamente inferida (tabela 3.4). A análise feita a partir de três grupos, embora revele que uma proporção estatisticamente significativa da variância molecular seja atribuída a diferenças entre os grupos/clados (73.87%), uma parcela ainda alta dessa variância permanece atribuída à diferenciação entre populações dentro de cada grupo (20.02%), demonstrando a existência de grupos estruturados dentro de cada clado (Fsc = 0.7661). A outra hipótese de agrupamento testada, a partir de dois grupos, foi inferida para avaliar o efeito da Serra do Mar (sentido Norte-Sul) na diversificação dessas populações, pela comparação das populações distribuídas a oeste da Serra do Mar com as populações distribuídas a leste da Serra do Mar. Foi verificado que, nessas condições, a porcentagem de variância obtida entre os grupos é menor (14.34%) do que a variância que é observada entre populações dentro de cada grupo (76.68%), demonstrando que tal agrupamento não tem suporte estatístico. Novamente, os índices de fixação demonstram a existência de grupos estruturados dentro de cada agrupamento (*Fsc* = 0.8951). Dessa forma, a Serra do Mar, considerada neste teste como uma unidade coesa (sentido Norte-Sul), não teve papel principal na separação entre

populações de *Gymnotus pantherinus*, de modo que não se verifica um grupo oeste diferentemente estruturado do grupo leste.

Ainda analisando o padrão de relacionamento entre haplótipos, apesar da associação geográfica verificada para as linhagens principais, dentro de cada clado o que se observa é um comportamento parafilético dos haplótipos, não havendo a mesma associação dentro de cada clado principal. Esse padrão filogenético sugere um processo de diversificação recente para as populações de *Gymnotus pantherinus*. Segundo Avise (2000), a maioria dos cenários geográficos e demográficos de especiação inicialmente resultam em parafiletismo dos táxons, quando o isolamento reprodutivo constitui a base para a definição da espécie. O mesmo ocorre com os conjuntos gênicos logo após sua separação original. Com o passar do tempo, a extinção de populações e linhagens freqüentemente converte o padrão parafilético em algo que, visto restropectivamente, retrata as formas viventes como grupos–irmãos que se originaram a partir de uma divisão dicotômica. Dessa forma, é natural que espécies ou populações separadas recentemente apresentem freqüentemente um padrão parafilético na árvore de genes (DeSalle *et al*, 1987; Satta and Takahata, 1990; Brown *et al*., 1996; Avise, 2000).

Apesar do parafiletismo das linhagens sugerindo um processo de diversificação recente para as populações de *Gymnotus pantherinus*, a população de Subaúma-SP apresenta sinais de expansão populacional recente, por apresentar valores negativamente significativos pelo teste *Fs* (Fu) (tabela 3.5) e também pelo padrão em estrela do relacionamento entre os haplótipos amostrados dessa localidade (figura 3.4). Entretanto, Subaúma-SP foi a única

localidade a apresentar sinais de expansão. A população de Cananéia, por sua vez, apresenta valores significativamente positivos para os testes *D** e *F** (Fu & Li), o que pode significar um processo de gargalo populacional recente. Para as demais populações, nenhuma assinatura demográfica foi significativamente encontrada.

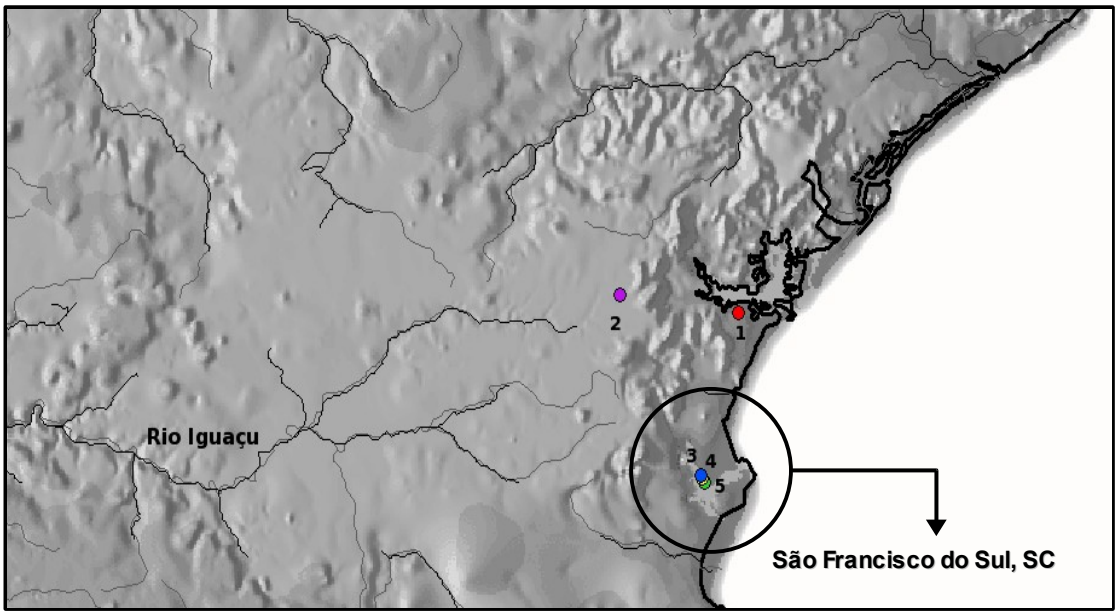

Figura 3.5 – Mapa parcial das drenagens destacando a proximidade geográfica das populações do Sul: (1) Paranaguá-PR; (2) Piraquara-PR; (3) São Francisco do Sul-SC, 1; (4) São Francisco do Sul-SC, 2; e, (5) São Francisco do Sul-SC, 3.

É importante ressaltar que uma grande dificuldade na interpretação e no desenvolvimento dos testes de neutralidade está em separar forças seletivas de eventos demográficos, porque ambos causam mudanças nas proporções de mutações das três classes: raras, abundantes e intermediárias. Por essa razão, é vasta a literatura que trata da definição dos testes, do desenvolvimento de

novos testes e da avaliação do poder estatístico de cada um deles (e.g., Fu & Li, 1993; Simonsen *et al.*, 1995; Fu, 1996, 1997; Nei & Kumar, 2000; Ramos-Onsins & Rozas, 2002; Depaulis *et al.*, 2003; Sano & Tachida, 2005). Alguns testes são reconhecidamente mais conservadores do que outros, embora de um modo geral haja um certo consenso em relação aos testes com maior poder de discriminação. Para casos de redução populacional (efeito gargalo), varredura seletiva ou estrutura populacional, embora o efeito sobre os testes possa variar dependendo da intensidade do evento, os testes *D* (Tajima), *D** e *F** (Fu & Li) parecem promissores (Simonsen *et al.*, 1995; Depaulis *et al.*, 2003). Já para casos de expansão demográfica recente, os testes que têm mostrado maior poder estatístico são o *Fs* (Fu) e o *R2* (Ramos-Onsins & Rozas) (Excoffier, 2001; Ramos-Onsins & Rozas, 2002; Sano & Tachida, 2005).

Aspectos filogeográficos e hipóteses de diversificação

Lidar com histórias paleogeográficas complexas é sempre a grande dificuldade dos estudos biogeográficos. A sobreposição de eventos geológicos distintos pode produzir alterações múltiplas sobre a área de distribuição das espécies, gerando padrões altamente complexos tanto para espécies de animais quanto de plantas (Nelson & Platnick, 1981; Myers & Giller, 1988; Hubert & Renno, 2006).

A região Neotropical exibe tal padrão biogeográfico complexo e várias hipóteses, baseadas em diferentes processos, têm sido propostas para explicar a origem da riqueza de espécies tropicais e os padrões de distribuição da América do Sul (Hubert & Renno, 2006).

A vicariância é um processo biogeográfico fundamental pelo qual populações previamente conectadas são separadas, facilitando o processo de diferenciação genética e especiação (Avise, 2000). Embora os impactos dos processos vicariantes (e.g., deriva continental, soerguimento de montanhas, oscilações climáticas do Pleistoceno) para a biota terrestre e marinha sejam relativamente bem estabelecidos, tais processos afetando a ictiofauna de água doce, principalmente sobre escalas de tempo recentes, são pouco compreendidos (Burridge *et al.*, 2006).

A captura de rios é um processo geomorfológico pelo qual rios e riachos são deslocadas de uma bacia hidrográfica para outra, promovendo a transferência de fauna entre drenagens (Burridge *et al.*, 2007). Eventos de captura de cabeceiras têm ganhado reconhecimento como um processo vicariante significativo promotor de cladogênese para a ictiofauna restrita a água doce (e.g., Mayden & Matson, 1992; Waters *et al.*, 1994, 2001; Gollmann *et al.*, 1997; Echelle & Echelle, 1998; Hurwood & Hughes, 1998; Strange, 1998; Kreiser *et al.*, 2001; Burridge *et al.*, 2006). Se a captura de rios é responsável pela distribuição das espécies de água doce, é esperado que as relações genéticas reportem as conexões hidrográficas históricas ao invés das conexões contemporâneas (Waters *et al.*, 2001; Burridge *et al.*, 2007). Segundo Burridge *et al.* (2006), tais eventos podem constituir um mecanismo importante para

expansão da ictiofauna de água doce. Enquanto outros eventos vicariantes podem apenas facilitar o processo de expansão durante longas escalas geológicas de tempo, a captura de rios pode promover a expansão, simultanemente ao processo de isolamento, em uma curta escala de tempo geológico.

Padrões topográficos e drenagens no leste e sudeste brasileiro oferecem evidências de tectonismo ativo, resultando, entre outros eventos, em capturas de rios por sistemas hídricos adjacentes (Cobbold *et al.*, 2001). As drenagens costeiras, no Brasil, abrigam diversas cabeceiras (Doce, Grande, Paraíba do Sul, Paranaíba, São Francisco, Tietê e rios costeiros menores), as quais são suscetíveis a capturas em diversos pontos, sendo os casos de captura mais conhecidos e bem relatados aqueles associados ao Alto Tietê e Alto Paraíba do Sul (Ab'Saber, 2003).

A observação do compartilhamento de fauna entre cabeceiras adjacentes tem sido a evidência utilizada na inferência desse processo em drenagens costeiras do leste e sudeste brasileiro. Weitzman *et al.* (1988) sugeriram que a presença de *Mimagoniates microlepis* no Alto Iguaçu fosse decorrente de tais eventos, nesse caso, translocando fauna dos riachos costeiros para o Rio Iguaçu. Outros trabalhos ainda reportam a translocação de espécies típicas das drenagens de planalto (como o Alto Tietê, por exemplo) para rios costeiros (e.g., Ribeiro, 2006; Ribeiro *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2007). O Rio Guaratuba, capturado do Alto Tietê para se tornar um tributário costeiro, é um dos casos bem relatados e descritos por meio de evidências faunística e geomorfológica (Ribeiro *et al.*, 2006).

As análises filogenéticas conduzidas no presente estudo demonstram que os haplótipos amostrados nas drenagens de planalto (i.e., Alto Tietê, Alto Paraíba do Sul e Alto Iguaçu) são mais proximamente relacionados aos haplótipos das drenagens costeiras em regiões geográficas adjacentes, mesmo quando amostrados em um mesmo sistema hídrico, como acontece com o Rio Paraíba do Sul (figuras 3.3, 3.4 e 3.6). Para essa drenagem, foram amostrados três pontos ao longo de toda a sua extensão, de tributários de ambas as margens do rio principal (tanto a leste quanto a oeste), notando-se que nas porções altas desse rio são encontrados haplótipos idênticos aos amostrados no Alto Tietê, enquanto em São José do Vale do Rio Preto-RJ, embora exista apenas um haplótipo exclusivo para essa localidade, este é mais proximamente relacionado aos amostrados em Cachoeiras do Macacu-RJ (rios costeiros). Esse padrão observado sugere que as drenagens amostradas a oeste da Serra do Mar tenham sua ictiofauna originada, possivelmente, a partir de eventos de capturas de drenagens costeiras.

Padrão inverso é registrado para o rio Ribeira de Iguape (figuras 3.3, 3.4 e 3.6), tipicamente costeiro. Na porção mais alta desse rio, a população de Juquitiba-SP apresenta um padrão haplotípico monomórfico compartilhado com as populações amostradas das drenagens do Alto Tietê e Alto Paraíba do Sul. Já a população amostrada em Iguape-SP, na desembocadura desse mesmo rio, os haplótipos amostrados são mais proximamente relacionados com as demais drenagens costeiras geograficamente adjacentes. Esse padrão sugere que a porção alta do rio Ribeira de Iguape esteja envolvida em processos de capturas de cabeceiras do Alto Tietê e adjacências.

No caso do Alto Tietê, Paranapiacaba-SP parece ser a localidade responsável pela conexão/dispersão das linhagens, por conter haplótipos compartilhados com populações de ambos os lados da Serra do Mar. A população de Paranapiacaba-SP é caracterizada pela presença do haplótipo 11 (22%), o qual é exclusivo das populações a oeste da Serra do Mar e pelos haplótipos 15 e 19 (22% e 44%, respectivamente), também compartilhados com Itanhaém-SP (rios costeiros), além do haplótipo 44 (11%) que é exclusivo dessa localidade.

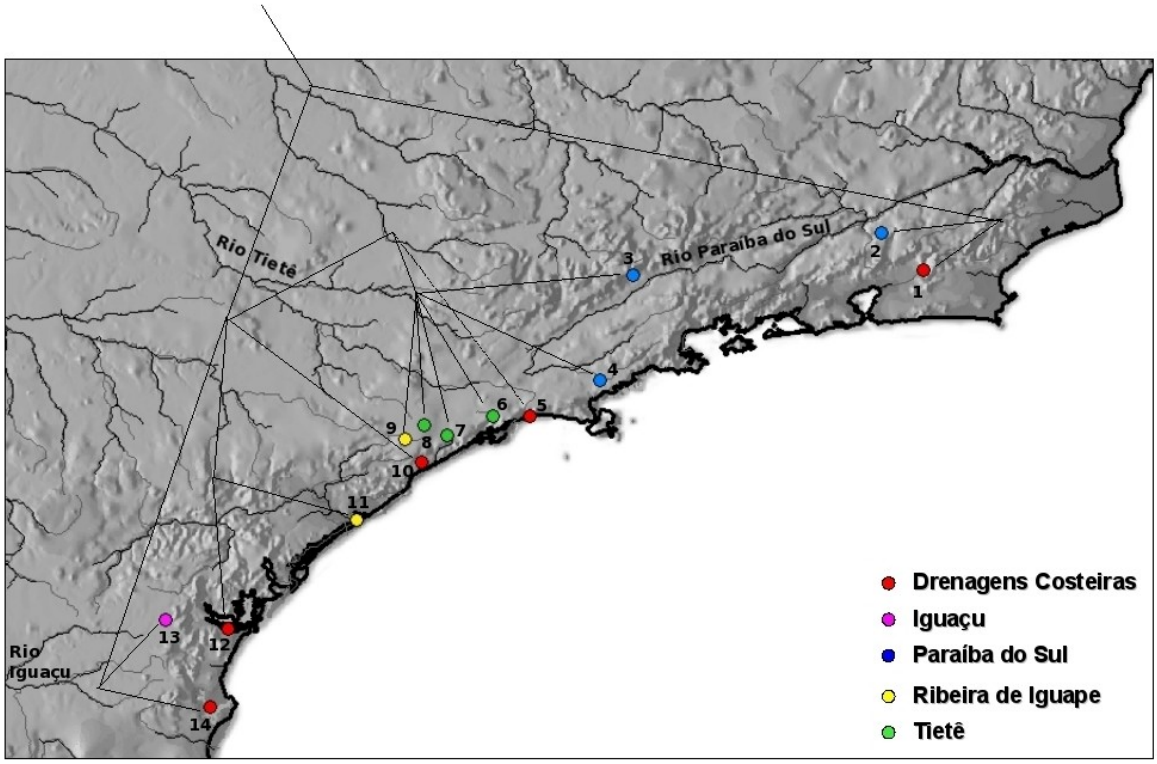

Figura 3.6 – Representação esquemática simplificada das relações filogenéticas entre as populações. (1) MAC-RJ; (2) SJV-RJ; (3) PIQ-SP; (4) NAT-SP; (5) BER-SP; (6) PRP-SP; (7) EMA-SP; (8) SLS-SP; (9) JUQ-SP; (10) ITA-SP; (11) IGU-SP; (12) PAG-PR; (13) PIR-PR; (14) SFS-SC.

Ainda analisando as figuras 3.3 e 3.4, nota-se que os haplótipos amostrados nas populações das drenagens a oeste da Serra do Mar têm em comum o estado derivado. Associado à esse fator, o padrão monomórfico também característico dessas populações sugere um processo recente de colonização, pelo qual as linhagens não tenham tido tempo suficiente para se diferenciarem. Nesse aspecto, nossos dados são consistentes com o processo recente de captura das drenagens costeiras do Brasil, como proposto para o Rio Guaratuba por Ribeiro *et al.* (2006).

Dessa forma, nossos resultados demonstram o intercâmbio de fauna, dos sistemas costeiros com os sistemas de planalto, em ambos os sentidos, possivelmente decorrente dos processos de captura de cabeceiras envolvendo drenagens adjacentes.

Em relação à divergência entre os clados principais, projeções localizadas da Serra do Mar parecem ter um papel importante no processo de cladogênese dessas linhagens. A análise filogenética dos haplótipos e a rede de haplótipos são congruentes na definição de três clados principais com clara associação geográfica: o Clado RJ, o clado Norte de SP e o Clado SP/Sul (figuras 3.3 e 3.4). Observando-se a configuração da Serra do Mar, pode-se notar que há porções da serra que terminam em uma borda alta escarpada, quase que diretamente sobre o mar, possivelmente impedindo o compartilhamento de fauna e o fluxo gênico entre drenagens vizinhas nessa posição. Como discutido previamente (capítulo 2), tais projeções ocorrem em regiões congruentes com os pontos de divergência mais profunda do relacionamento entre as linhagens,

de modo que essa conformação da Serra do Mar pode estar envolvida no processo histórico de separação das linhagens principais de *Gymnotus pantherinus*.

Por outro lado, considerando-se mais especificamente as populações distribuídas a leste da Serra do Mar, o padrão de divergência recente exibido pelas linhagens dentro de cada um dos clados principais, associado à alta estruturação registrada entre as populações, permite inferir que possivelmente esse padrão de diversificação esteja associado à flutuações do nível do mar, ocorridas especialmente em decorrência do Último Máximo Glacial (UMG, ~ 20.000 anos atrás). A hipótese de diversificação a partir de flutuações do nível do mar postula que ciclos alternantes de diminuição e elevação do nível do mar, conseqüentemente alternando concomitantemente o nível dos rios, alterem de modo significativo a distribuição espacial e o tamanho das populações de peixes de água doce. Isso acontece por meio de eventos repetidos de interconexões e desconexões das drenagens, promovendo inicialmente a dispersão da ictiofauna, seguida de diversificação alopátrica (Cardoso & Montoya-Burgos, 2009). Populações podem ainda ser extintas nesse processo, principalmente em riachos de cabeceiras que são estreitos e rasos, ou ter seu número efetivo bastante reduzido. Nesse cenário, o baixo nível do mar pode permitir que algumas populações se conectem temporariamente na platoforma continental recém exposta, permitindo fluxo gênico entre elas, enquanto a elevação do nível do mar seja responsável pela redistribuição dessa ictiofauna em drenagens isoladas (figura 3.7). Os riachos de planície, evidentemente, seriam os mais influenciados por essa dinâmica, de modo que tais populações

devam ser as primeiras a serem colapsadas e as últimas a serem isoladas novamente. Em termos de expansão e divergência recente, esse padrão é recuperado em nossas análises, pelo clado SP/Sul. É também nessa região, São Paulo – Sul, que a plataforma continental se apresenta mais extensa (figura 3.7), o que poderia permitir uma área mais ampla de panmixia para as populações que putativamente tenham se estabelecido nessa região.

A história evolutiva dos peixes de água doce é particularmente informativa para o estudo dos efeitos das glaciações, a localização de refúgios durante os períodos frios e a colonização de novos hábitats após os recuos glaciais (Bernatchez *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2001; Salzburger *et al.*, 2003). Vários grupos de peixes demonstram os efeitos das flutuações do nível do mar em seu padrão de diversificação. Para ciprinídeos da Europa central, *Leuciscus souffia*, Salzburger *et al.* (2003) sugerem a existência de duas zonas principais de refúgio, uma na Itália e outra provavelmente no sistema Danúbio, apontando a colonização recente do sistema *Rhine* pós período glacial.

Embora os efeitos das mudanças climáticas, associadas aos ciclos glaciais do Quaternário, tenham reconhecidamente alterado a distribuição e a estruturação genética da fauna e da flora na América do Norte e na Europa (Avise, 2000; Hewitt, 2000), pouca informação existe sobre os mesmos efeitos para o Hemisfério Sul (Beheregaray, 2008; Ruzzante *et al.*, 2008). Na região da Patagônia, Ruzzante *et al.* (2008) descrevem um comportamento diferencial para espécies de peixes com características ecológicas distintas, sob influência das mudanças climáticas do Pleistoceno. Enquanto populações de *Galaxias platei* sofreram intensa redução populacional durante o Último Máximo

Figura 3.7 – Mapa da superfície da América do Sul, destacando a plataforma continental. As setas em vermelho esquematizam o fluxo dos indivíduos nos períodos em que o nível do mar baixou, estabelecendo um possível contato entre as populações.

Glacial, populações de *Percichthys trucha* mostraram um crescimento contínuo através dos dois últimos ciclos glaciais, tendo sofrido uma importante redução populacional há cerca de 180.000 anos.

Na região sul do Brasil, morfotipos lacustres da espécie *Odontesthes perugiae* demonstraram um padrão de diversificação genética congruente com a história geográfica da planície costeira, sugerindo um processo de radiação cronologicamente modulada pelas alterações do nível do mar durante o Pleistoceno e Holoceno, pelo depósito de uma série de barreiras descontínuas de areia, paralelas à costa, os quais são bem determinados geologicamente (Villwock & Tomazelli, 1995; Beheregaray *et al.*, 2002). Baseados em dados morfológicos e genéticos, os autores propõem a existência de pelo menos três espécies alopátricas e duas espécies simpátricas, apresentando uma taxa excepcionalmente alta de especiação.

Para as drenagens costeiras da região das Guianas, região de condições ecológicas e geomorfológica muito semelhante à área estudada no presente trabalho, o padrão de diversificação de *Pseudancistrus brevispinis*, espécie endêmica dessa região, indica que a dispersão entre as rios costeiros das Guianas tenha ocorrido principalmente por conexões temporárias entre drenagens adjacentes durante os períodos em que o nível do mar esteve baixo, embora eventos de capturas de cabeceiras não possam ser descartados. Com a elevação do nível do mar, populações isoladas podem ter divergido, conduzindo à grande diversidade revelada pelos dados genéticos para o grupo (Cardoso & Montoya-Burgos, 2009). Esse cenário de diversificação é bastante congruente com o padrão de diversidade genética apresentado por *Gymnotus pantherinus*

e, dadas as similaridades ecológicas e topográficas dos riachos em questão, consideramos que talvez essa semelhança não seja casual, mas sim, um padrão geral de diversificação para as drenagens costeiras da margem Atlântica Sul-Americana.

Dessa forma, a idéia de que o Pleistoceno tenha sido um período favorável ao intenso processo de especiação tem sido recorrentemente refutada para a ictiofauna de água doce (Near *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2006). Entretanto, o Pleistoceno parece ter sido um período de significante diversificação entre linhagens, como tem sido demonstrado para várias espécies de peixes de água doce (Near *et al.*, 2003; Cardoso & Montoya-Burgos, 2009).

Considerações sobre a Conservação da ictiofauna dos riachos costeiros de Mata Atlântica

A identificação de unidades taxonômicas e populações adequadas para a proteção e manejo é essencial para a conservação da diversidade biológica. Nesse contexto, os marcadores genéticos têm ajudado a resolver muitos problemas taxonômicos, além de mapear os padrões de diversidade dentro e entre populações, incluindo àquelas remanescentes de espécies ameaçadas e em perigo de extinção. O conhecimento dos padrões históricos de fluxo gênico e da diversidade genética das populações naturais pode contribuir com o manejo adequado de populações antropogenicamente fragmentadas, sendo também importante na concepção de programas de reprodução em cativeiro, a fim de se

evitar a endogamia e a seleção artificial, que podem interferir na aptidão e na estabilidade a longo prazo das espécies (Vrijenhoek, 1998).

Os programas de conservação têm como objetivo a manutenção da variabilidade intra-específica a fim de maximizar a preservação da diversidade biológica. Contraditoriamente, os programas de conservação estão geralmente focados em espécies que já se apresentam extremamente reduzidas, cuja reprodução pode estar comprometida, e muito provavelmente venham a ser extintas antes mesmo que possam se adaptar aos desafios ambientais (Latta, 2008). Genes, espécies e ecossistemas são os três níveis primários de biodiversidade reconhecidos pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) e parece claro que todos eles devem ser vislumbrados para o sucesso dos programas de conservação da biodiversidade (Allendorf & Luikart, 2007).

A descrição da estrutura de populações é um tópico comum na literatura sobre genética da conservação, por ser uma forma de se mensurar os níveis de fluxo gênico e de diferenciação entre populações. Populações isoladas a muito tempo apresentam conjuntos gênicos particulares, muitas vezes adaptadas localmente, de modo que a identificação da estrutura filogeográfica das populações é um critério importante e amplamente usado para a determinação de unidades evolutivas distintas para planos de conservação da biodiversidade.

Uma *Unidade Evolutiva Significativa* (UES) pode ser definida como uma população ou grupo de populações que merecem um gerenciamento particular ou prioriodade de conservação, em função de características distintivas, sejam genéticas ou ecológicas (Allendorf & Luikart, 2007). Proposto em 1986 por Ryder, o termo em sua essência foi definido como populações que representam variações adaptativas significativas, caracterizadas por fontes

distintas de informação concordantes entre si (Allendorf & Luikart, 2007), com o objetivo de alertar que os programas de cativeiro, como os parques zoológicos, são capazes de "preservar" apenas uma parcela muito pequena da diversidade biológica, de uma pequena variedade de espécies de megavertebrados carismáticos.

O termo tornou-se operacional como a unidade mínima distinta para programas de conservação (Vogler & Desalle, 1994), embora os métodos pelos quais as UESs são definidas sejam ainda foco de muitas discussões (Brower, 1999; Sites & Marshall, 2003). Os métodos de delineamento das UES vão desde aqueles baseados em caracteres, como é o caso da Análise de Populações Agregadas (PAA; Davis & Nixon, 1992), a qual determina os perfis dos estados de caráter para as populações, agregando populações de mesmo perfil, até métodos baseados na construção de árvores, que se baseiam na topologias das árvores filogenéticas para a delimitação das UESs (*Cladistic Haplotype Aggregation*, Brower, 1999; Teste de Coesão de Templeton, Templeton, 1998).

A alta estruturação apresentada pelas populações estudadas de *Gymnotus pantherinus* demonstra a heterogeneidade genética da espécie ao longo de sua distribuição geográfica. Assim, nossos dados sugerem a existência de populações discretas representando UESs distintas, como proposto por Ryder (1986).

A análise filogenética conduzida no presente estudo nos permite delimitar claramente alguns grupos de populações dentro dos parâmetros de UESs. No contexto filogenético, uma UES é definida quando os haplótipos amostrados para as populações são unidos em uma seção contígua,

monofilética, e separados de outras populações por um único ramo (Brower, 1999). A figura 3.8 mostra o consenso estrito das 18 árvores de haplótipos mais parcimoniosas obtidas para as populações de *G. pantherinus*. Além dos três clados principais recuperados (Clado RJ, Clado Norte de SP e Clado SP/Sul), dois grupos adicionais são reconhecidos dentro dessas linhagens. O primeiro deles, incluído no Clado RJ, é composto pelas populações de Cachoeiras do Macacu e São José do Vale do Rio Preto, e o segundo, incluído no clado SP/Sul, é formado pelas populações de Piraquara-PR e São Francisco do Sul – SC, riachos 2 e 3. Dessa forma, reconhecemos que as populações de *G. pantherinus* constituem pelo menos cinco UESs, as quais merecem atenção diferenciada no que se refere a medidas de preservação e/ou gerenciamento de hábitats. Considerando a alta diversidade de hábitats que caracteriza os riachos costeiros, a diversidade genética e a estruturação populacional verificada para as populações de *G. pantherinus* podem ter um significado adaptativo local a longo prazo, embora tal associação não tenha sido avaliada em nossas análises.

Outro aspecto interessante é notar que os valores mais altos de diversidade genética foram registrados para as populações do Estado de São Paulo, especialmente àquelas associadas ao Vale do Ribeira de Iguape. Coincidentemente ou não, essa região é a mais privilegiada em termos de conservação florestal. Protegidas pelas escarpas da Serra de Paranapiacaba, as matas do Vale do Ribeira passaram praticamente incólumes à destruição ocorrida no restante da região Sul e Sudeste, além de abrigar a maior concentração de Unidades de Conservação, incluindo Parques, Estações Ecológicas e Áreas de Proteção Ambiental (Oyakama *et al.*, 2006).

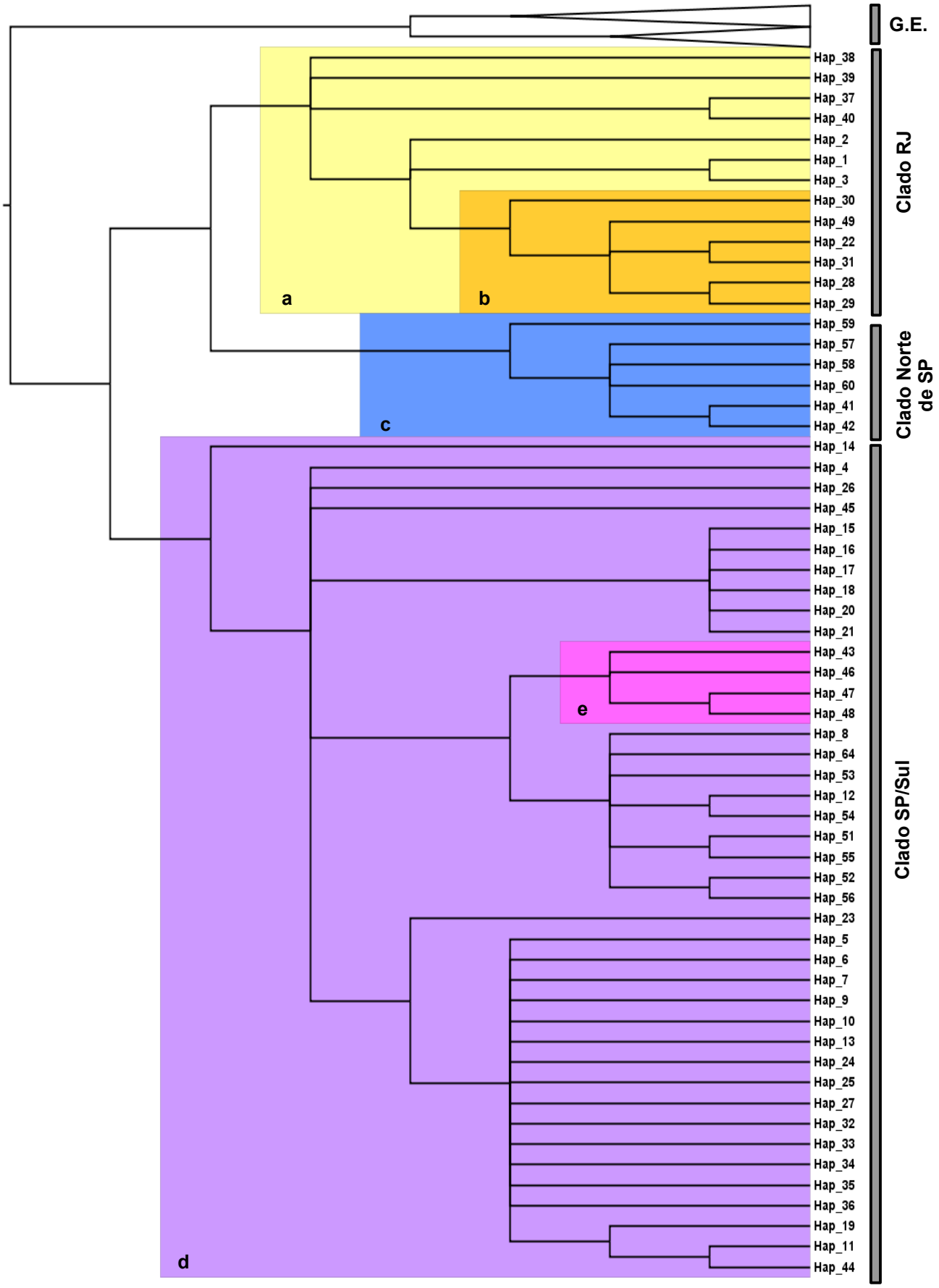

Figura 3.8 – Consenso estrito das árvores de haplótipos, sob o critério de Parcimônia, delimitando grupos de populações que constituem Unidades Evolutivas Significativas. (a) Clado RJ; (b) Cachoeiras de Macacu e São José do Vale do Rio Preto, RJ; (c) Clado Norte de SP; (d) Clado SP/Sul; e, (e) Piraquara-PR e São Francisco do Sul – SC, riachos 2 e 3.

Gymnotus pantherinus, assim como outras espécies de peixes endêmicas dos riachos de Mata Atlântica, são muito restritivos em relação às qualidades do hábitat. Em nossas coletas, algo muito evidente é que a abundância de indivíduos esteve sempre positivamente relacionada com a qualidade dos riachos, sendo mais facilmente encontrados em áreas onde a Mata Ciliar estava presente e áreas livres do despejo de esgoto doméstico.

A Mata Atlântica tem sofrido um grave e contínuo processo de dregradação associado à ocupação humana, pelo crescimento das cidades e das indústrias, restanto atualmente cerca de 5% da cobertura vegetal original. Pequenas áreas remanescentes, concentradas principalmente nas regiões Sul e Sudeste, estão restritas praticamente às Unidades de Conservação desse Ecossistema, ou ainda, à regiões da Serra do Mar em que, por causa da alta declividade do relevo e dos solos pouco produtivos, foi em parte poupada da ocupação humana (Oyakawa *et al.*, 2006).

Dessa forma, ressaltamos a importância da preservação dos hábitats como um todo, preservando as condições naturais dos ambientes, as quais as populações de peixes estão adaptados, garantindo condições de sobrevivência às especies. A heterogeneidade genética de *G. pantherinus* ao longo de sua distribuição geográfica parece ser resultante de processos geomorfológicos históricos e das flutuações do nível do mar ocorridas durante o UMG, entretanto, a degradação da Mata Atlântica tende a reduzir o tamanho das populações, comprometendo a viabilidade da espécie, já que em muitas regiões desta distribuição, principalmente àquelas cujo impacto humano fora mais intenso, a ocorrência da espécie parece bastante restrita (observação pessoal).

- Considerações Finais -

Considerações Finais

No presente trabalho, foram utilizadas ferramentas moleculares para a avaliação do *status* taxônomico do Complexo Pantherinus e para o estudo da diversidade genética, estrutura populacional e padrões demográficos de *Gymnotus pantherinus* (senso estrito). Esse constitui o primeiro estudo filogeográfico para espécies de peixes dos riachos da Mata Atlântica.

- Nossos resultados mostram que o Complexo Pantherinus é composto por cinco linhagens geográficas estatisticamente significantes, das quais aquela representada por espécimes da Bahia e Espírito Santo é a que apresenta maior divergência. Sugere-se que essa linhagem seja reconhecida como uma nova espécie, reforçando a proposta prévia de Campos-da-Paz (1997) e Gonçalves (2005) baseada na análise de caracteres morfológicos.

- As demais linhagens, dentre as quais a mais recente é a linhagem de *G. pantherinus* (senso estrito), foram consideradas como espécies incipientes, demonstrando um aspecto gradual do processo de especiação.

- As linhagens de *G. pantherinus* evidenciadas pelos dados moleculares não foram identificadas pelas análises morfológicas conduzidas por Gonçalves (2005). Os clados 2 (Norte de SP), 3 e 4 (RJ), recuperados pelos dados moleculares, não apresentaram variação morfológica significativa.

- Ainda em oposição aos resultados de Gonçalves (2005), os dados moleculares não corroboram a linhagem de São Francisco do Sul – SC como uma nova espécie. Ao contrário, os haplótipos recuperados para essa localidade apresentam-se contidos no clado 5, que é o clado de divergência mais recente e que representa *G. pantherinus*, senso estrito.

- A cladogênese associada ao processo de divergência entre as espécies, definidas pelo presente estudo, parece estar relacionada à presença do Rio Doce como agente vicariante. As demais linhagens de *G. pantherinus* parecem ter seu processo de diversificação associado barreiras geográficas, resultantes da conformação da Serra do Mar.

- De um modo geral, populações associadas ao Vale do Ribeira apresentaram altos valores de diversidade genética, tanto haplotípica quanto nucleotídica. É nessa região que a planície costeira se apresenta mais extensa, permitindo maior mobilidade aos rios e possivelmente populações com tamanhos efetivos maiores. Por outro lado, populações localizadas em regiões mais elevadas, presentes em riachos encaixados na porção serrana, apresentam índices de diversidade bem menores, possivelmente pelo maior isolamento dessas populações.

- As populações de *G. pantherinus* mostraram-se altamente estruturadas, apresentando baixo compartilhamento de haplótipos e muitos haplótipos exclusivos. Valores significativos de estruturação foram obtidos tanto pelos valores de *Fst* e pelo Teste Exato de Diferenciação, quanto pelos resultados da AMOVA.

- O padrão de relacionamento entre os haplótipos demonstra a existência de três linhagens principais, com clara associação geográfica, sendo elas: (1) Rio de Janeiro; (2) Norte de São Paulo; e, (3) Centro-Sul de São Paulo, Paraná e Santa Catarina.

- Dentro de cada clado principal, os haplótipos mostraram-se parafiléticos, não havendo a mesma associação geográfica verificada entre os clados. Esse padrão filogenético sugere um processo de diversificação recente para as populações de *G. pantherinus*.

- Evidências de expansão populacional em Subaúma-SP foram fornecidas pelo teste de neutralidade *Fs* (Fu) e pelo padrão em estrela do relacionamento entre os haplótipos amostrados nessa localidade. Já a população de Cananéia, apresentou valores significativamente positivos para os testes *D** e *F** (Fu & Li), o que pode sugerir um processo de gargalo populacional recente. Para as demais populações, nenhuma assinatura demográfica significativa foi encontrada.

- O grupo que representa as drenagens do Alto Tietê, Alto Paraíba do Sul e Alto Ribeira de Iguape (Engenheiro Marcilac-SP, Juquitiba-SP, Natividade da Serra-SP, Piquete-SP e São Lourenço da Serra-SP) apresenta um padrão filogeográfico interessante. Tais populações compartilham entre si um único haplótipo, o qual se apresenta derivado em relação aos demais haplótipos amostrados para *G. pantherinus*. Esse padrão pode ser resultante de uma colonização recente, a partir um número reduzido de fundadores (efeito fundador), sugerindo que processos tectônicos recentes

tenham remodelado as drenagens, promovendo a dispersão/conexão de linhagens entre planalto e planície, em ambos os sentidos.

- A configuração da Serra do Mar teve papel histórico na diversificação do grupo, possivelmente determinando o padrão de diversificação entre os clados principais de *G. pantherinus*.

- Alterações do nível do mar, ocorridas em decorrência do Último Máximo Glacial, parece ser a explicação mais plausível para o padrão de divergência recente recuperado pelo clado SP/Sul.

- A degradação ambiental e a conseqüente redução dos hábitats naturais pode ter influência determinante na redução populacional e na perda da diversidade genética. Registramos no presente estudo que muitas populações de *G. pantherinus* apresentam valores baixos de diversidade genética, muitas delas caracterizadas por um padrão haplotípico monomórfico. Apesar do marcador mitocondrial utilizado neste estudo apresentar uma taxa de evolução relativamente baixa e conseqüentemente insuficiente para se mensurar os efeitos tão recentes decorrentes da ocupação humana, a baixa diversidade registrada é no mínimo sugestiva de tais eventos de redução populacional.

- O alto grau de isolamento identificado entre as populações de *G. pantherinus* tem implicações diretas na conservação dessa espécie. Estratégias de conservação contemplam a manutenção da estabilidade populacional, a restauração do fluxo gênico entre populações

antropogenicamente fragmentadas e até mesmo a translocação de espécies para áreas não ameaçadas. Uma estratégia em potencial é priorizar a preservação de áreas onde a persistência das populações seja mais provável, a qual possa servir como fonte de recolonização de localidades menos estáveis. Seja qual for a estratégia a ser empregada, o conhecimento sobre o comportamento natural dessas populações é indispensável, desde a compreensão dos níveis de diversidade genética, estruturação populacional, fluxo gênico e dos padrões de diversificação.

- Nossos resultados demonstram a existência de pelo menos cinco Unidades Evolutivas Significativas para *G. pantherinus*, as quais devem ser priorizadas no que se refere à medidas de preservação dos riachos de Mata Atlântica.

Acreditamos que o conhecimento taxonômico e da história evolutiva das populações sejam indispensáveis para qualquer decisão a respeito do manejo e da conservação das espécies, priorizando a manutenção da diversidade genética de modo que as espécies tenham condições de se aptarem ao ambiente em suas constantes modificações. Dessa forma, a preservação dos hábitats e das condições ecológicas essenciais para a sobrevivência das espécies nos parece ser o caminho mais adequado.

- Resumo e Abstract -

Resumo

Gymnotus pantherinus é uma espécie de peixe endêmica das drenagens costeiras brasileiras com distribuição desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, embora evidências morfológicas sugiram que esse táxon constitua um complexo de espécies. No presente trabalho, foram conduzidas análises filogenéticas com base em marcadores moleculares, mitocondriais e nucleares, com o objetivo de avaliar o *status* taxonômico do grupo. Padrões demográficos foram também inferidos para as populações de *Gymnotus pantherinus* (senso estrito). As análises filogenéticas sob o critério de Parcimônia, bem como as inferências bayesianas, mostraram que o grupo é composto por cinco linhagens geográficas estatisticamente bem suportadas. Das cinco linhagens identificadas, aquela composta por espécimes da Bahia e Espírito Santo é também suportada por evidências morfológicas, a qual propomos que seja reconhecida como uma nova espécie. As demais linhagens, das quais a mais recente é a de *Gymnotus pantherinus* senso estrito, foram consideradas como espécies incipientes. As análises populacionais revelaram que as populações de *Gymnotus pantherinus* (senso estrito) se apresentam altamente estruturadas, exibindo um alto índice de fixação e baixo compartilhamento de haplótipos, sendo reconhecidas três linhagens principais com alta associação geográfica. A maior diversidade genética foi encontrada na região do Vale do Ribeira e o clado SP/Sul é o que apresenta a divergência mais recente, a qual pode ter ocorrido após o Último Máximo Glacial (UMG). Populações localizadas a oeste da Serra do Mar (Paraíba do Sul, Alto Tietê e Alto Iguaçu) demonstram maior similaridade com drenagens adjacentes a leste, o que reforça a hipótese de captura de cabeceiras entre drenagens previamente postulada a partir do compartilhamento de fauna. Finalmente, os resultados apontam a existência de pelo menos cinco Unidades Evolutivas Significativas para a espécie, tendo implicações importantes na conservação dos riachos de Mata Atlântica.

Abstract

Gymnotus pantherinus is an endemic fish species found in the Brazilian coastal drainages occurring from Bahia to Rio Grande do Sul states. Morphological evidence has suggested that *Gymnotus pantherinus* might constitute a species complex. In the present study, the taxonomic status of *Gymnotus* species group has been evaluated using both mitochondrial and nuclear markers. Demographic patterns have also been inferred for the *Gymnotus pantherinus* populations (*stricto sensus*). Parsimony and Bayesian phylogenetic inferences showed that the group is composed of five well supported geographic lineages. From those, a well supported lineage constituted by the specimens from Bahia and Espírito Santo states is also corroborated by morphological data. Thus, it is suggested that this lineage be recognized as a new species within *Gymnotus*. The other lineages, from which the most recent representative is the *Gymnotus pantherinus* lineage itself, have been considered as incipient species. The population analysis showed highly structured populations with low number of shared haplotypes and three main phylogenetic lineages with high geographic association. The higher genetic diversity was found in the Ribeira Valley region, while the clade SP/South was the most recently diverged, which may have occurred after the Last Glacial Maximum. Populations occurring west of the Serra do Mar were more closely related to the adjacent east drainages, which strengthens the hypothesis of headwaters stream capture. Finally, at least five evolutionary significant units can be recognized, with important implications for the conservation of Atlantic Forest streams.

- Referências Bibliográficas -

Referências Bibliográficas

CAPÍTULO I

Ab'Saber, A.N. 2003. *Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas*. São Paulo: Ateliê Editorial. 159 p.

Albert, J.S; Campos-da-Paz, R. 1998. Phylogenetics systematics of Gymnotiformes with diagnoses of 58 clades: a review of available data. *In*: Malabarba, L.R; Reis, R.E; Vari, R.P; Lucena, Z.M; Lucena, C.A (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 419-446.

Albert, J.S. (2001). Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). *Misc. Publ. Mus. Zool. University of Michigan*, *190,* 1-129.

Albert, J.S., & Crampton, W.G. (2003). Seven new species of the Neotropical electric fish Gymnotus (Teleostei, Gymnotiformes) with a redescription of *G. carapo* (Linnaeus). *Zootaxa*, *287*, 1 – 54.

Albert, J.S., Crampton, W.G., Thorsen, D.H., & Lovejoy, N.R. (2005). Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). *Systematics and Biodiversity*, *2*, 375-417.

Albert, J.S, & Fink, W.L. (2007). Phylogenetic relationships of fossil neotropical electric fishes (Ostheichthyes: Gymnotiformes) from the upper Miocene of Bolivia. *Journal of Vertebrate Paleontology*, *27* (1), 17-25.

Brown, K.S., & Ab'Saber, A.N. (1979). Ice-age forest refuges and evolution in Neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with biological endemism. *Paleoclimas, 5*, 1–30.

Cabanne, G. S., Horta, F. M., Sari, E. H., Santos, F. R., & Miyaki, C. Y. (2008). Molecular Phylogenetics and Evolution Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic Xiphorhynchus fuscus (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *49*, 760-773. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.ympev.2008.09.013.

Campos-da-Paz, R. (1997). S*istemática e taxonomia dos peixes elétricos das bacias dos rios Paraguai, Paraná e São Francisco, com notas sobre espécies presentes em rios costeiros do leste do Brasil (Teleostei: Ostariophysi: Gymnotiformes)*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 336 p.

Campos-da-Paz, R. (2003). Family Gymnotidae. *In*: Reis, R.E., Kullander, S.O., & Ferrari-Jr, C.J**.** *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre:

EDIPUCRS, 742 p.

Cardoso, Y. P. & Montoya-Burgos, J.I. (2009). Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region. *Molecular Ecology*, *18*, 947-964.

Carnaval, A.C. & Moritz, C. (2008). Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, *35*, 1187-1201.

Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F., Rodrigues, M.T. & Moritz, C. (2009). Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, *323*, 785-789.

Casatti, L., Langeani, F., Silva, A. M., & Castro, R. M. (2006). Stream fish, water and habitat quality in a pasture dominated basin, Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, *66*(2B), 681-696.

Casatti, L., Ferreira, C. P., & Langeani, F. (2009). A fish-based biotic integrity index for assessment of lowland streams in southeastern Brazil. *Hydrobiologia*, *623*, 173-189. doi: 10.1007/s10750-008-9656-x.

Cobbold, P.R., Meisling, K.E. & Mount, V.S. (2001). Reactivation of an obliquely rifted margin, Campos and Santos basins, southeastern Brazil. *AAPG Bulletin*, *85*, 1925-1944.

Couceiro, S. R., Hamada, N., Luz, S. L., Forsberg, B. R., & Pimentel, T. P. (2007). Deforestation and sewage effects on aquatic macroinvertebrates in urban streams in Manaus, Amazonas, Brazil. *Hydrobiologia*, *575*, 271-284. doi: 10.1007/s10750- 006-0373-z.

Cox, K. G. (1989). The role of mantle plumes in the development of continental drainage patterns. *Nature*, *342,* 873–876.

Crampton, W. G. R., Thorsen, D. H., & Albert, J. S. (2005). Three new species from a diverse sympatric assemblage of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) in the lowland Amazon basin, with notes on ecology. *Copeia*, *2005,* 82-89.

Crampton, W.G.R., & Albert, J.S. (2006). Evolution of electric signal diversity in gymnotiform fishes. *In*: Ladich, F., Collin, S.P., Moller, P. & Kapoor, B.G (eds.). *Communication in Fishes*. Science Publishers Inc., Enfield, NH. pp. 641-725.

Eigenmann, C. H. (1908). Preliminary descriptions of new genera of tetragonopterid characins. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, *52*, 94-106.

Fernandes, C.C., Podos, J., & Lundberg, J.G. (2004). Amazonian Ecology: Tributaries Enhance the Diversity of Eletric Fishes. *Science*, *305*, 1960-1962.

Fernandes-Matioli, F.M.de C. (1999). Evolução e estrutura de populações no gênero *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 165 p.

Fonteles, S.B.A, Fernandes, F.M.C, Lopes, C.A., & Almeida-Toledo, L.F. (2005). Distribuição geográfica de *Gymnotus pantherinus* (Pisces: Gymnotiformes): uma revisão. *Livro de Resumos do XVI Encontro Brasileiro de Ictiologia*, p.199.

Frankham, R., Ballou, J.D., & Briscoe, D.A. (2008). *Fundamentos de Genética da Conservação.* Ribeirão Preto, SP: Editora SBG. 280 p.

Froese, R., & Pauly, D. (2010) (Eds.) *FishBase.* World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (09/2010).

Gayet, M., & Meunier, F.J. (1991). Première découverte de Gymnotiformes fossiles (Pisces, Ostariophysi) dans le Miocène supérieur de Bolivie. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris, 313*, 471–476.

Gerhard, P., Moraes, R., & Molander, S. (2004). Stream fish communities and their associations to habitat variables in a rain forest reserve in southeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, *71*, 321-340.

Gonçalves, M. P. (2005). *Revisão taxonômica do Complexo Gymnotus pantherinus (Steindachner, 1908) (Teleostei: Gymnotiformes).* Dissertação de Mestrado, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 90 p.

Gray, J.E. (1858). Synopsis of the families and genera of axiferous zoophytes or barked corals. *Proceedings of the Zoological Society London*, 25, 278-294.

Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S., & Bonatto, S.L. (2006). Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, *15*, 3969-3982.

Hubert, N., Duponchelle, F., Nuñez, J., Garcia-Davila, C., Paugy, D., & Renno, J.F. (2007). Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical Ichthyofauna. *Molecular Ecology, 16*, 2115–2136.

Hubert, N., & Renno, J. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*. doi: 10.1111/j.1365-2699.2006.01518.x

Lissmann, H.W. (1958). On the function and evolution of electric organs in fish. *Jounal of Experimental Biology*, *35*, 156-191.

Lovejoy, N.R., Lester, K., Crampton, W.G., Marques, F.P. & Albert, J.S. (2010). Molecular Phylogenetics and Evolution Phylogeny, biogeography, and electric signal evolution of Neotropical knifefishes of the genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *54*, 278-290.

Lundberg, J.G. (1993). African-South American freshwater fish clades and continetal drift: problems with a paradigm. *In*: Goldblatt, P. (Ed.) *Biological Relationships Between Africa and South America.* Yale University Press, New Haven. pp. 156–199.

Lundberg, J.G; Fernandes, C.C; Albert, J.S; Garcia, M. 1996. *Magosternarchus*, a new genus with two new species of electric fish (Gymnotiformes: Apteronotidae) from the Amazon River basin, South America. *Copeia*, 1996, 657-670.

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

Mago-Leccia, F. (1994). Electric fishes of the continental waters of America. *Biblioteca de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales,* 29, Caracas, Venezuela. 1-225.

Maitland, P. (1995). The conservation of freshwater fish: Past and present experience. *Biological Conservation*, *72*, 259-270.

Melo, C. E., Lima, J. D., & Silva, E. F. (2009). Relationships between water transparency and abundance of Cynodontidae species in the Bananal floodplain, Mato Grosso, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, *7*(2), 251-256.

Menezes, N. A. (1996). Methods for assessing freshwater fish diversity. *In*: Bicudo, C.E.M. & Menezes, N. A. (Eds.) *Biodiversity in Brazil: a first approach*. CNPq, Brasil.

Menezes, N.A, Weitzman, S.H, Oyakawa, O.T, Lima, F.C.T.de, Castro, R.M.C, & Weitzman, M.J. (2007). *Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais.* São Paulo: Museu de Zoologia - Universidade de São Paulo. 408 p.

Menezes, N.A., Ribeiro, A.C., Weitzman, S. & Torres, R.A. (2008). Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Zootaxa*, *1726*, 33 - 48.

Milhomem, S. S., Pieczarka, J. C., Crampton, W. G., Silva, D. S., De Souza, A. C., Carvalho-Jr, J. R., & Nagamachi, C. Y. (2008). Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae), *BMC Genetics*, *9*(75). http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2009.09.017.

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

Moritz, C., Patton, J.L., Schneider, C.J. & Smith, T.B. (2000). Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology Systematics*, *31*, 533-563.

Moysés, C.B. (2005). *Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero Eigenmannia (Pisces: Gymnotiformes)*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 220 p.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, *403*, 853-858.

Nagamachi, C.Y,, Pieczarka, J.C., Milhomem, S.S.R., O'Brien, P.C.M., Souza, A.C.P., & Ferguson-Smith, M.A. (2010). Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. *BMC Genetics*, *11*(28). http://www.biomedcentral.com/1471-2156/11/28 .

Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the world*. *Order A Journal On The Theory Of Ordered Sets And Its Applications*. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons.

Oyakawa, O.T, Akama, A, Mautari, K.C, & Nolasco, J.C. (2006). *Peixes de riachos da Mata Atlântica*. São Paulo: Editora Neotrópica. 201 p.

Pellegrino, K.C., Rodrigues, M.T., Waite, A.N., Morando, M., Yassuda, Y.Y. & Sites-Jr, J.W. (2005). Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 13-26.

Potter, P. E. (1997). The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: A natural history. *Journal of South American Earth Sciences*, *10*(5–6): 331–344.

Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferrari-Jr, C.J. (2003). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 742 p.

Ribeiro, A. C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil : an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, *4*(2), 225-246.

Riccomini, C. & Assumpção, M. (1999). Quaternary tectonics in Brazil. *Episodes*, *22*(3): 221–225.

Rodrigues, M.T. (1987). Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *torquatus* ao sul do rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia, 31*, 105–230.

Rodrigues, M.T. (1990). Os lagartos da floresta Atlântica Brasileira: distribuição atual e pretérita e suas implicações para estudos futuros. II. Simpósio de ecossistemas da costa sul e sudeste Brasileira. Estutura, função e manejo. *Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 71,* 404–410.

Rohr, D.M, & Huddleston, R.W. (1982). *Yochelsoniella,* nom. nov., a new name for *Ellisella* Rohr, 1980 (Gastropoda) non Gray, 1858 (Coelenterata). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, *95* (269).

Sarmento-Soares, L. M., & Martins-Pinheiro, R. F. (2006). Rachoviscus graciliceps (Characidae: Incertae Sedis) sobrevivente nos pequenos riachos do extremo sul da Bahia, Brasil. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 4-5.

Shaffer, E.L. (1917). On the electric organs of *Gymnotus carapo*. *Science*, *45*, 67-69.

Sivasundar, A., Bermingham, E. & Orti, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, *10*, 407- 417.

Steindachner, F. (1908). *Brachyplatystoma* – Art aus dem Rio Parnahyba und über eine dicht gefleckte und gestrichelte varietät von *Giton fasciatus* aus dem Gewässern von Santos (Staat São Paulo). *Anzeiger der Akademie der Wissenshaften*, Wien, *45*, 123-130.

Vanzolini, P.E., & Williams, E.E. (1970). South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria: Iguanidae). *Arquivos de Zoologia, 19*, 1–298.

Vari, R. P. (1988). The Curimatidae, a lowland neotropical fish family (Pisces: Characiformes): distribution, endemism and phylogenetic biogeography. *In*: Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R. (Eds.) *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 488 p.

Vari, R. P., & Weitzman, S. H.. (1990). A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America. Pp. 381–393. *In*: Peters, G. & Hutterer, R. (Eds.). *Vertebrates in the Tropics.* Proceedings of the International Symposium on Vertebrate Biogeography and Systematics in the Tropics, Bonn, June 5–8, 1989. Alexander Koenig Zoological Research Institute and Zoological Museum, Bonn, 424p.

Weitzman, S.H., Menezes, N.A., Weitzman, M.J. (1988). Phylogenetic Biogeography of the *Glandulocaudini* (Teleostei: Characiformes, Caracidae) with comments on the distribuition of other freswater fishes in Eastern and Southeastern Brasil. *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribuition Patterns*, p.379-427.

CAPÍTULO II

Albert, J.S. (2001). *Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei)*. Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich. 190, 1–129.

Albert, J.S., & Campos-da-Paz, R. (1998). Phylogenetic systematics of gymnotiformes with diagnoses of 58 clades: a review of available data. *In*: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., & Lucena, C.A.S. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes.* Edipucrs, Porto Alegre, pp. 419–443.

Albert, J.S., & Crampton, W.G.R. (2001). Five new species of *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes) from an Upper Amazon floodplain, with descriptions of electric organ discharges and ecology. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, *12*, 241– 266.

Albert, J.S., & Crampton, W.G.R. (2003). Seven new species of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes) with a redescription of *G. carapo* (Linnaeus). *Zootaxa*, *287*, 1–54.

Albert, J.S., Fernandes-Matioli, F.M.D., & Almeida-Toledo, L.F. (1999). New species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) from southeastern Brazil: toward the deconstruction of *Gymnotus carapo*. *Copeia, 1999*, 410–421.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., & Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*, 403-410.

Arévalo, E., Davis, S.K., & Sites, J.W. (1994). Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in Central Maxico. *Systematic Biology*, *43*, 387-418.

Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA. 447 p.

Ballard, J.W.O., & Whitlock, M.C. (2004) The incomplete natural history of mitochondria.

Molecular Ecology, *13*, 729-744.

Birstein, V.J., Doukakis, P., Sorkin, B. & Desalle, R. (1998) Population aggregation analysis of three caviar-producing species of sturgeons and implications for the species identification of black caviar. *Conservation Biology, 12*: 766–775.

Bremer, K. (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics*, *10*, 295-304.

Brown, W.M., George, M.Jr, & Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*,1967-1971.

Calcagnotto, D., Schaefer, S.A. & Desalle, R. (2005) Relationships among characiform Wshes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *36*, 135-153.

Campos-da-Paz, R. (1997). *Sistemática e taxonomia dos peixes elétricos das bacias dos rios Paraguai, Paraná e São Francisco, com notas sobre espécies presentes em rios costeiros do leste do Brasil (Teleostei: Ostariophysi: Gymnotiformes).* Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 336 p.

Campos-da-Paz, R. (2002). *Gymnotus diamantinensis*, a new species of electric knifefish from upper rio Arinos basin, Brazil (Ostariophysi: Gymnotidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters, 13*, 185–192.

Carvalho, G.R., & Hauser, L. (1999). Molecular markers and the species concept: new techniques to resolve old disputes? *Reviews in Fish Biology and Fisheries, 9*, 379-382.

Chiachio, M.C., Oliveira, C. & Montoya-Burgos, J.I. (2008). Molecular Phylogenetics and Evolution Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *49*, 606-617.

Chow, S. & Hazama, K. (1998). Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology*, *7*, 1255-1256.

Cracraft, J. (2000). Species Concepts in Theoretical and Applied Biology: A Systematic Debate with Consequences. *In*: Wheeler, Q.D., Meier, R. (Eds.) *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*. New York: Columbia University Press, pp. 3-14.

Crampton, W.G.R., Lovejoy, N.R., & Albert, J.S. (2003). *Gymnotus ucamara*: a new species of Neotropical electric fish from the Peruvian Amazon (Ostariophysi: Gymnotidae), with notes on ecology and electric organ discharges. *Zootaxa*, *277*, 1–18.

Crampton, W.G.R., Thorsen, D.H., & Albert, J.S. (2005). Three new species from a diverse and sympatric assemblage of the electric fish *Gymnotus* (Ostariophysi:Gymnotidae) in the lowland Amazon Basin, with notes on ecology. *Copeia*, *2005*, 82–99.

Crespi, B.J. & Fulton, M.J. (2004). Molecular systematics of Salmonidae : combined nuclear data yields a robust phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *31*, 658-679.

Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favored Races in the Struggle for Life*. London: John Murray, 502 p.

de la Torre, J. E., Egan, M. G., Katari, M. S., Brenner, E. D., Stevenson, D. W., Coruzzi, G. M., & DeSalle, R. (2006). ESTimating plant phylogeny: lessons from partitioning. *BMC Evolutionary Biology*, *6*(48). doi: 10.1186/1471-2148-6-48.

Doyle, J.J. (1992). Gene Trees and Species Trees: Molecular Systematics as One-Character Taxonomy. *Systematic Botany*, *17*, 144-163.

Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research, 32*(5), 1792-1797.

Edwards, S.V., & Beerli, P. (2000). Gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, *54*(6): 1839–1854.

Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, *8*(3), 186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, *8*(3), 175-185.

Fernandes, F. M., Albert, J. S., Daniel-Silva, M. F. Z., Lopes, C. E., Crampton, W. G., & Almeida-Toledo, L. F. (2005). A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. *Zootaxa*, *933*, 1 – 14.

Ferreira, ME & Grattapaglia, D. (1996). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2a. ed., Brasília, EMBRAPA-CENARGEN. 220 p.

Froese, R., & D. Pauly. (Eds). (2010). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (07/2010).

Gatesy, J., O'Grady, P., & Baker, R. H. (1999). Corroboration among Data Sets in Simultaneous Analysis: Hidden Support for Phylogenetic Relationships among Higher Level Artiodactyl Taxa. *Cladistics*, *15*, 271-313. doi: 10.1111/j.1096-0031.1999. tb00268.x.

Giannasi, N., Malhotra, A. & Thorpe, R.S. (2001). Nuclear and mtDNA Phylogenies of the Trimeresurus Complex: Implications for the Gene versus Species Tree Debate. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *19*, 57- 66.

Goloboff, P. A., Farris, J. S., & Nixon, K. C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, *24*, 774-786.

Gonçalves, M. P. (2005). *Revisão taxonômica do Complexo Gymnotus pantherinus (Steindachner, 1908) (Teleostei; Gymnotiformes)*. Dissertação. UFRJ, Museu Nacional, Rio de Janeiro, 90 p.

Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research, 8*, 195-202.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis

program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series, 41*, 95-98.

Harrison, R.G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecoogy and Evolution*, *4*, 6-11.

Hauser, L., Carvalho, G.R. & Pitcher, T.J. (1998). Genetic similarity of a phenotypically divergent population of the clupeid Limnothrissa miodon following introduction into a man-made lake. *In*: Cowx, I.G. (ed.) *Stocking and Introductions of Fish*. Fishing News Books, Blackwell Scientific Ltd., Oxford, pp. 338– 354.

Hillis, D.M., Moritz, C., & Mable, B.K. (1996). *Molecular Systematics*. 2a. ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 655 p.

Holder, M., & Lewis, P. O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature reviews. Genetics*, *4*(4), 275-84. doi: 10.1038/nrg1044.

Hubert, N., & Renno, J. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*. doi: 10.1111/j.1365-2699.2006.01518.x.

Hubert, N., Duponchelle, F., Nunez, J., Garcia-Davila, C., Paugy, D. & Renno, J. (2007). Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology, 16*(10), 2115-36.

Huelsenbeck, J.P. & Crandall, K.A. (1997). Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Systematic*, *28*, 437-466.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X. & Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(16), 6196-6200.

Lovejoy, N.R., Lester, K., Crampton, W.G., Marques, F.P. & Albert, J.S. (2010). Molecular Phylogenetics and Evolution Phylogeny, biogeography, and electric signal evolution of Neotropical knifefishes of the genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *54*, 278-290.

Maldonado-Ocampo, J.A., & Albert, J.S. (2004). *Gymnotus ardilai*: a new species of Neotropical electric fish (Ostariophysi: Gymnotidae) from the Rio Magdalena of Colombia. *Zootaxa*, *759*, 1–10.

Mayden, R. L. (1997). A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. *In*: Claridge, M. A., Dawah, H. A., & Wilson, M. R. (eds.). *Species: The Units of Diversity.* London: Chapman & Hall. pp. 381–424.

Mayden, R.L., & Wood, R.M. (1995). Systematics, species concepts and the evolutionary significant unit in biodiversity and conservation biology. *American Fisheries Society Symposium*, *17*, 58–113.

Meier, R. (2008). DNA Sequences in Taxonomy: Opportunities and Challenges. *In*: Wheeler, Q. D. (Ed.) *The New Taxonomy*. Tempe, USA: CRC Press, pp.95-128.

Memon, N., Meier, R., Mannan, A. & Su Feng-Yi, K. (2006). On the use of DNA sequences for

determining the species limits of a polymorphic new species in the stink bug genus Halys (Heteroptera: Pentatomidae) from Pakistan. *Systematic Entomology*, *31*, 703–710.

Menezes, N. A., Ribeiro, A. C., Weitzman, S., & Torres, R. A. (2008). Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei : Characiformes : Characidae). *Zootaxa*, *1726*, 33 – 48.

Milhomem, S.S., Pieczarka, J.C., Crampton, W.G., Silva, D.S., Souza, A.C., Carvalho-Jr, J.R. & Nagamachi, C.Y. (2008). Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genetics*, *9*, 1-10. doi:10.1186/1471-2156-9-75.

Moritz, C., Patton, J. L., Schneider, C. J., & Smith, T. B. (2000). Diversification of rainforest faunas: An Integrated Molecular Approach. *Annual Review of Ecology Systematics*, *31*, 533-563.

Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C., Milhomem, S.S., O'Brien, P.C., de Souza, A.C. & Ferguson-Smith, M.A. (2010). Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. *BMC Genetics*, *11*. doi:10.1186/1471-2156-11-28.

Palumbi, S.R. (1996). Nuclei Acids II: The Polymerase Chain Reaction. *In*: Hillis, D.H., Moritz, C., & Mable, B.K. (Eds.) *Molecular Systematics.* Sunderland, Massachusetts (USA): Sinauer Associates, Inc. 655 p.

Palumbi, S.R., & Cipriano, F. (1998). Species identification using genetic tools: The value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *Journal of Heredity*, *89*, 459–464.

Pank, M., Stanhope, M., Natanson, L., Kohler, N. & Shivji, M. (2001). Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks Carcharhinus obscurus and *Carcharhinus plumbeus* (*Carcharhinidae*) using multplex PCR. *Marine Biotechnology*, *3*, 231–240.

Pereira, S.L., Baker, A.J. & Wajntal, A. (2002). Combined nuclear and mitochondrial DNA sequences resolve generic relationship within the *Cracidae* (Galliformes, Aves). *Systematics Biology*, *51*, 946-958.

Petersen, F.T., Meier, R., Kutty, S.N., & Wiegmann, B.M. (2007). The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *45*, 111–122.

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

Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007). *Tracer v.1.4*, Available from http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer.

Ribeiro, A. C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil : an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, *4*(2), 225-246.

Ribeiro, A.C, Lima, F.C.T., Riccomini, C., & Menezes, N.A. (2006). Fishes of the Atlantic

Rainforest of Boracéia: testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, *17*(2), 157-164.

Richer-de-Forges, M.M., Crampton, W.G.R., & Albert, J.S. (2009). A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in Neurophysiological Research. *Copeia*, *2009*, 538–544.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes v.3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics, 19*(12), 1572-1574.

Russo, C.A. (2001). Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos? *In*: Matioli, S.R. (Ed.). *Biologia Molecular e Evolução*, Editora Holos, Ribeirão Preto-SP, pp.130-136.

Russo, C.A., Takezaki, N. & Nei, M. (1996). Efficiencies of Different Genes and Different Tree-building in Recovering a Known Vertebrate Phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, *13*, 525-536.

Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, *5*(1), 63-69. doi: 10.1038/nrg1249.

Simmons, M. P., Pickett, K. M., & Miya, M. (2004). How meaningful are Bayesian support values? *Molecular Biology and Evolution*, *21*(1), 188-99. doi: 10.1093/molbev/msh014.

Slade, R.W., Moritz, C. & Heideman, A. (1994). Multiple Nuclear-Gene Phylogenies: Application to Pinnipeds and Comparison with a Mitochondrial DNA Gene Phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, *11*, 341-356.

Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution, 15*, 199-203.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution, 24*, 1596-1599.

Uieda, V. S. (1995). *Comunidade de peixes de um riacho litorâneo: composição, habitat e hábitos*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 229 p.

Vogler, A. P., & Desalle, R. (1994). Diagnosing Units of Conservation Management. *Conservation Biology*, *8*(2), 354-363.

Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, *74*, 329-356. doi: 10.1111/j.1095-8649. 2008.02080.x.

Wheeler, Q. D., & Meier, R. (2000). *Species concepts and phylogenetic theory: a debate.* New York: Columbia University Press, 230 p.

CAPÍTULO III

AB'Saber, N.A. (2003). Megamorfologia do território brasileiro. *In*: Cunha, S.B. & Guerra, A.J.T. (Eds.) *Geomorfologia do Brasil*. Bertand Brasil, 3ª. ed. Rio de Janeiro, pp.71-106.

Allendorf, F. W. & Luikart, G. (2006). *Conservation and the Genetics of Populations*. Wiley-Blackwell, 664 p.

Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA. 447 p.

Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *16*, 37-48.

Beerli, P., & Felsenstein, J. (2001). Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sized in *n* subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*, 4563-4568.

Beheregaray, L. B., Sunnucks, P., & Briscoe, D. A. (2002). A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside Odontesthes perugiae complex. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, *269*(1486), 65-73. doi: 10.1098/rspb.2001.1838.

Beheregaray, L.B. (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, *17*, 3754–3774.

Bernatchez, L., Guyomard, R. & Bonhomme, F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout Salmo trutto populations. *Molecular Ecology*, *1*, 161–173.

Bremer, K. (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics*, *10*, 295-304.

Brower, A. V. Z. (1999). Delimitation of phylogenetic species with DNA sequences: a critique of Davis and Nixon's population aggregation analysis. *Systematic Biology*, *48*, 199-231.

Brown, J. M., Abrahamson, W. G. & Way, P. A. (1996). Mitochondrial DNA phylogeography of host races of the goldenrod ball gallmaker, *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Evolution*, *50*, 777-786.

Burridge, C. P., Craw, D., & Waters, J. M. (2006). River capture, range expansion, and cladogenesis: the genetic signature of freshwater vicariance. *Evolution*, *60*(5), 1038-1049.

Burridge, C. P., Craw, D., & Waters, J. M. (2007). An empirical test of freshwater vicariance via river capture. *Molecular Ecology*. doi:10.1111/j.1365-294X.2006. 03196.x.

Cardoso, Y. P., & Montoya-Burgos, J. I. (2009). Unexpected diversity in the catfish Pseudancistrus brevispinis reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region. *Molecular Ecology*, *18*, 947-964. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.04068.x.

Cobbold, P. R., Meisling, K.E., & Mount, V. S. (2001). Reactivation of an obliquely rifted margin, Campos and Santos basins, southeastern Brazil. *AAPG Bulletin*, *85*(11), 1925-1944.

Davis, J. L. & Nixon, K. C. (1992). Population, genetic variation and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology*, *41*, 421-435.

Depaulis, F., Mousset, S., & Veuille, M. (2003). Power of neutrality tests to detect bottlenecks and hitchhiking. *Journal of molecular evolution*, *57 Suppl 1*, S190-200. doi: 10.1007/s00239-003-0027-y.

Desalle, R., Templeton, A., Mori, I., Pletscher, S. & Johnston, J. S. (1987). Temporal and spatial heterogeneity of mtDNA polymorphism in natural populations of Drosophila mercatorum. *Genetics*, *116*(2), 15-223.

Echelle, A. A., & Echelle, A. F. (1998). Evolutionary relationships of pupfishes in the *Cyprinodon eximius* complex (Atherinomorpha: Cyprinodontiformes). *Copeia*, *1998*, 852–865.

Excoffier, L. (2001). Analysis of population subdivision. *In*: Balding, D.J., Bishop, M., & Cannings, C. (Eds.). *Handbook of Statistical Genetics*. New York: John Wiley. pp. 271-307.

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

Excoffier, Laval, L. G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, *1*, 47-50.
Fu, Y. (1996). New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics*, *143*(1), 557-570.

Fu, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and backgroud selection. *Genetics*, *147*, 915-925.

Fu, Y., & Li, W. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, *133*, 693-709. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1208208&tool= pmcentrez& rendertype=abstract.

Gollmann, G., Bouvet, Y., Karakousis, Y., & Triantaphyllidis, C. (1997). Genetic variability in Chrondostoma from Austrian, French and Greek Rivers (Teleostei, Cyprinidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 35*, 165–169.

Goloboff, P. A., Farris, J. S., & Nixon, K. C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, *24*, 774-786.

Goudet, J., Raymond, M., de-Meeüs, T. D., & Rousset, F. (1996). Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, *144*(4), 1933-1940.

Grant, W. S., & Bowen, B. W. (1998). Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. *Journal of Heredity*, *89*(5), 415-426.

Hedrick, P. W. (2005). *Genetics of populations*. 3rd ed. Jones and Bartlett, Boston, MA. 675 p.

Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, *405*, 907–913.

Hubert, N., & Renno, J. F. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*. doi:10.1111/j.1365-2699.2006.01518.x.N

Hurwood, D. A., & Hughes, J. M. (1998). Phylogeography of the freshwater fish, Mogurnda adspersa, in streams of northeastern Queensland, Australia: evidence for altered drainage patterns. *Molecular Ecology*, *7*, 1507–1517.

Kreiser, B. R., Mitton, J. B., & Woodling, J. D. (2001). Phylogeography of the plains killifish, Fundulus zebrinus. *Evolution*, *55*, 339–350.

Latta, R. G. (2008). Conservation genetics as applied evolution : from genetic pattern to evolutionary process. *Evolutionary Applications*, *1*, 84-94.

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

Mayden, R. L. & Matson, R. H. (1992). Systematics and biogeography of the Tennessee shiner, *Notropis leuciodus* (Cope) (Teleostei, Cyprinidae). *Copeia*, *1992*, 954–968.

Meffe, G.K & Vrijenhoek, R.C. (1998). Conservation genetic in the management of desert fishes. *Conservation Biology*, *2*, 157-169.

Menezes, N.A, Weitzman, S.H, Oyakawa, O.T, Lima, F.C.T.de, Castro, R.M.C, & Weitzman, M.J. (2007). *Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais.* São Paulo: Museu de Zoologia - Universidade de São Paulo. 408 p.

Moysés, C.B. (2005). *Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero Eigenmannia (Pisces: Gymnotiformes)*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 220 p.

Myers, A.A. & Giller, P.S. (1988). *Analytical biogeography: an integrated approach to the study of animals and plant distributions*. Chapman and Hall, London. pp. 578.

Near, T. J., Kassler, T. W., Koppelman, J. B., Dillman, C. B., & Philipp, D. P. (2003). Speciation in north american black basses, *Micropterus* (Actinopterygii: Centrarchidae). *Evolution*, *57*(7), 1610-1621.

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

Nei, M. & Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Neigel, J. (2002). Is F ST obsolete?. *Conservation Genetics, 3*, 167-173.

Nelson, G. & Platnick, N. (1981). *Systematics and biogeography: cladistics and vicariance*. Columbia University Press, New York. pp.567.

Oyakawa, O.T, Akama, A, Mautari, K.C, & Nolasco, J.C. (2006). *Peixes de riachos da Mata Atlântica*. São Paulo: Editora Neotrópica. 201 p.

Ramos-Onsins, S.E. & Rozas, J. (2002). Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution*, *19*, 2092-2100.

Raymond, M., & Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, *49*, 1280-1283.

Ribeiro, A. C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil : an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, *4*(2), 225-246.

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

Ruzzante, D. E., Walde, S. J., Gosse, J. C., Cussac, V. E., Habit, E., Zemlak, T. S., et al. (2008). Climate control on ancestral population dynamics: insight from patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03738.x.

Ryder, O. A. (1986). Species Conservation and Systematics: the Dilemma of Subspecies. *Trends in Ecoogy and Evolution*, *1*(1), 1-2.

Salzburger, W., Brandstätter, A., Gilles, A., Parson, W., Hempel, M., Sturmbauer, C., et al. (2003). Phylogeography of the vairone (Leuciscus souffia, Risso 1826) in Central Europe. *Molecular Ecology*, *12*, 2371-2386. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01911.x.

Sano, A., & Tachida, H. (2005). Gene genealogy and properties of test statistics of neutrality under population growth. *Genetics*, *169*(3), 1687-97. doi: 10.1534/ genetics. 104.032797.

Satta, Y. & Takahata, N. (1990). Evolution of Drosophila mitochondrial DNA and the history of the melanogaster subgroup. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*, 9558–9562.

Serra, J. P., Carvalho, F. R., & Langeani, F. (2007). Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo State: composition and biogeography. *Biota Neotropica*, *7*(1), 81-86.

Simonsen, K. L., Churchill, G. A., & Aquadro, C. F. (1995). Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics*, *141*(1), 413-429.

Sites-Jr, J. W., & Marshall, J. C. (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Evolution*, *18*(9), 462-470. doi: 10.1016/S0169-5347(03)00184-8.

Smith, C.T., Nelson, R.J., Wood, C.C. & Koop, B.F. (2001). Glacial biogeography of North American coho salmon (Oncorhynchus kisutch). *Molecular Ecology*, *10*, 2775–2785.

Strange, R. M. (1998). MtDNA variation in Johnny darters (Pisces: Percidae) from eastern Kentucky supports stream capture for the origin of upper Cumberland River fishes. *American Midland Naturalist*, *140*, 96–102.

Swofford, D.L. (2001). *PAUP*. Phylogenetics Analysis Using Parsimony (* and Others*

Methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, *123*, 585-595.

Templeton, A. R. (1998). Nested Clade Analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, *7*, 381-397.

Villwock, J. A., & Tomazelli, L. J. (1995). Geologia costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas*, *8*,1–45.

Vogler, A. P. & Desalle, R. (1994). Diagnosing units of Conservation Management. *Conservation Biology*, *8*(2), 534-563.

Vrijenhoek, R. C. (1998). Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, *53*(Supplement A), 394-412.

Ward, R.D., Woodwark, M. & Skibinski, D.O.F. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, *44*, 213-232.

Waters, J. M., Craw, D., Youngson, J. H., & Wallis, G. P. (2001). Genes Meet Geology: Fish Phylogeographic Pattern Reflects Ancient, Rather than Modern, Drainage Connections. *Evolution*, *55*(9), 1844-1851.

Waters, J. M., Lintermans, M., & White, R. W. G. (1994). Mitochondrial DNA variation suggests river capture as a source of vicariance in *Gadopsis bispinosus* (Pisces: Gadopsidae). *Journal of Fish Biology*, *44*, 549–551.

Weitzman, S.H., Menezes, N.A., Weitzman, M.J. (1988). Phylogenetic Biogeography of the *Glandulocaudini* (Teleostei: Characiformes, Caracidae) with comments on the distribuition of other freswater fishes in Eastern and Southeastern Brasil. *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribuition Patterns*, p.379-427.

Whitlock, M. C., & Mccauley, D. E. (1999). Indirect measures of gene flow and migration: FST ≠ 1/(4Nm+1). *Heredity, 82*, 117-125.

- Anexos -

Relação das espécies válidas do gênero *Gymnotus* (Froese & Pauly, 2010)

#	Espécie	Referência	Distribuição
1.	*Gymnotus anguillaris*	Hoedeman, 1962	Bacia Amazonas-Orinoco
2.	*Gymnotus arapaima*	Albert & Crampton, 2001	Amazonia Central, sistema lacustre Mamirauá e lago Tefé
3.	*Gymnotus ardilai*	Maldonado-Ocampo & Albert, 2004	Bacia do Rio Magdalena, Colômbia
4.	*Gymnotus bahianus*	Campos-da-Paz & Costa, 1996	Localidade tipo e arredores, Ilheús, Bahia
5.	*Gymnotus carapo*	Linnaeus, 1758	Sul do México até Paraguai
6.	*Gymnotus cataniapo*	Mago-Leccia, 1994	Bacia dos Rios Amazonas e Orinoco
7.	*Gymnotus chaviro*	Maxime & Albert, 2009	Alto Yuruá e Rios Manu e Tampobata, Peru
8.	*Gymnotus chimarrao*	Cognato, Richer-de-Forges, Albert & Crampton, 2008	Drenagem do Rio Taquari, Arroio Grande
9.	*Gymnotus choco*	Albert, Crampton & Maldonado, 2003	Drenagem do Rio Baudó e Rio Atrato, Colômbia
10.	*Gymnotus coatesi*	La Monte, 1935	Bacia Amazônica e áreas ao norte da América do Sul
11.	*Gymnotus coropinae*	Hoedeman, 1962	Bacia Amazonas-Orinoco e escudo das Guianas
12.	*Gymnotus curupira*	Crampton, Thorsen & Albert, 2005	Planície Amazônica, Brasil e Peru
13.	*Gymnotus cylindricus*	La Monte, 1935	Bacia do Rio Motagua, Guatemala
14.	*Gymnotus diamantinensis*	Campos-da-Paz, 2002	Bacia do Rio Tapajós
15.	*Gymnotus esmeraldas*	Albert & Crampton, 2003	Bacia do Rio Guayaquil, Equador
16.	*Gymnotus henni*	Albert, Crampton & Maldonado, 2003	Rio Calima e Rio Juradó, Colômbia
17.	*Gymnotus inaequilabiatus*	Valenciennes, 1839	Bacia do Rio Paraguai
18.	*Gymnotus javari*	Albert, Crampton & Hagedorn, 2003	Amazônia Ocidental, a partir do Rio Amazonas e porções baixas das bacias Napo, Javari e Ucayali
19.	*Gymnotus jonasi*	Albert & Crampton, 2001	Bacia do Rio Amazonas
20.	*Gymnotus maculosus*	Albert & Miller, 1995	America Central
21.	*Gymnotus mamiraua*	Albert & Crampton, 2001	Sistemas lacustres de Mamirauá e Janauacá, Amazonas
22.	*Gymnotus melanopleura*	Albert & Crampton, 2001	Sistema lacustre Mamirauá, Amazonas e drenagem do Rio Napo, Peru
23.	*Gymnotus obscurus*	Crampton, Thorsen & Albert, 2005	Confllluência do Rio Solimões (Amazonas) e Rio Japurá, Reserva de Mamirauá, Amazonas
24.	*Gymnotus omarorum*	Richer-de-Forges, Crampton & Albert, 2009	Uruguai
25.	*Gymnotus onca*	Albert & Crampton, 2001	Alto Amazonas
26.	*Gymnotus panamensis*	Albert & Crampton, 2003	Rio Cricamola, Panamá
27.	*Gymnotus pantanal*	Fernandes *et al.*, 2005	Brasil, Paraguai e Bolívia
28.	*Gymnotus pantherinus*	Steindachner, 1908	Drenagens costeiras do sudeste brasileiro
29.	*Gymnotus paraguensis*	Albert & Crampton, 2003	Bacia do Paraná-Paraguai
30.	*Gymnotus pedanopterus*	Mago-Leccia, 1994	Sul da Venezuela e tributários do Rio Negro (Brasil)
31.	*Gymnotus stenoleucus*	Mago-Leccia, 1994	Sul da Venezuela, Guiana Venezuelana e Território Amazonas
32.	*Gymnotus sylvius*	Albert & Fernandes-Matioli, 1999	Bacias do Ribeira de Iguape, Paraíba do Sul e Rio Pardo
33.	*Gymnotus tigre*	Albert & Crampton, 2003	Bacias do Amazonas e Tapajós, no Brasil, e Rio Pastaza, Equador
34.	*Gymnotus ucamara*	Crampton, Lovejoy & Albert, 2003	Rio Ucayali, Peru
35.	*Gymnotus varzea*	Crampton, Thorsen & Albert, 2005	Bacia Amazônica, Brasil e Peru

ANEXO 2

Distância p (não corrigida) entre as seqüências mitocondriais

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	*E.electricus*																								
2	*G.carapo*	0.2624																							
3	*G.silvius*	0.2550	0.0471																						
4	*G.pantanal*	0.2524	0.0845	0.0801																					
5	ANG620	0.2535	0.1342	0.1268	0.1383																				
6	ANG658	0.2535	0.1342	0.1268	0.1383	0.0000																			
7	ARI452	0.2561	0.1357	0.1271	0.1394	0.0141	0.0141																		
8	ARI454	0.2561	0.1357	0.1271	0.1394	0.0141	0.0141	0.0000																	
9	ARI455	0.2561	0.1357	0.1271	0.1394	0.0141	0.0141	0.0000	0.0000																
10	BER571	0.2546	0.1338	0.1253	0.1379	0.0126	0.0126	0.0022	0.0022	0.0022															
11	BER572	0.2543	0.1353	0.1268	0.1394	0.0148	0.0148	0.0044	0.0044	0.0044	0.0030														
12	CAN456	0.2550	0.1345	0.1260	0.1379	0.0148	0.0148	0.0044	0.0044	0.0044	0.0030	0.0022													
13	CAN458	0.2557	0.1353	0.1271	0.1386	0.0133	0.0133	0.0007	0.0007	0.0007	0.0022	0.0044	0.0044												
14	EMA128	0.2550	0.1353	0.1268	0.1394	0.0152	0.0152	0.0048	0.0048	0.0048	0.0033	0.0019	0.0026	0.0048											
15	EMA130	0.2550	0.1353	0.1268	0.1394	0.0152	0.0152	0.0048	0.0048	0.0048	0.0033	0.0019	0.0026	0.0048	0.0000										
16	EUN007	0.2583	0.1394	0.1319	0.1397	0.0230	0.0230	0.0237	0.0237	0.0237	0.0230	**0.0252**	0.0245	0.0237	**0.0256**	**0.0256**									
17	EUN013	0.2587	0.1397	0.1323	0.1401	0.0234	0.0234	0.0241	0.0241	0.0241	0.0234	**0.0256**	0.0248	0.0241	**0.0259**	**0.0259**	0.0004								
18	IGU472	0.2550	0.1342	0.1256	0.1383	0.0122	0.0122	0.0019	0.0019	0.0019	0.0004	0.0026	0.0026	0.0019	0.0030	0.0030	0.0226	0.0230							
19	IGU476	0.2554	0.1345	0.1253	0.1394	0.0141	0.0141	0.0044	0.0044	0.0044	0.0030	0.0030	0.0030	0.0044	0.0033	0.0033	0.0252	0.0256	0.0026						
20	ITA747	0.2554	0.1338	0.1253	0.1379	0.0137	0.0137	0.0033	0.0033	0.0033	0.0019	0.0041	0.0041	0.0033	0.0044	0.0044	0.0241	0.0245	0.0015	0.0041					
21	ITA748	0.2561	0.1353	0.1268	0.1390	0.0141	0.0141	0.0007	0.0007	0.0007	0.0022	0.0044	0.0044	0.0007	0.0048	0.0048	0.0237	0.0241	0.0019	0.0044	0.0033				
22	JAP537	0.2539	0.1349	0.1275	0.1375	0.0052	0.0052	0.0163	0.0163	0.0163	0.0148	0.0170	0.0170	0.0156	0.0174	0.0174	0.0245	0.0248	0.0145	0.0163	0.0159	0.0163			
23	JAP538	0.2539	0.1349	0.1275	0.1375	0.0052	0.0052	0.0163	0.0163	0.0163	0.0148	0.0170	0.0170	0.0156	0.0174	0.0174	0.0245	0.0248	0.0145	0.0163	0.0159	0.0163	0.0000		
24	JAP539	0.2539	0.1349	0.1275	0.1375	0.0052	0.0052	0.0163	0.0163	0.0163	0.0148	0.0170	0.0170	0.0156	0.0174	0.0174	0.0245	0.0248	0.0145	0.0163	0.0159	0.0163	0.0000	0.0000	
25	JUQ520	0.2550	0.1353	0.1268	0.1394	0.0152	0.0152	0.0048	0.0048	0.0048	0.0033	0.0019	0.0026	0.0048	0.0000	0.0000	**0.0256**	**0.0259**	0.0030	0.0033	0.0044	0.0048	0.0174	0.0174	0.0174
26	JUQ522	0.2550	0.1353	0.1268	0.1394	0.0152	0.0152	0.0048	0.0048	0.0048	0.0033	0.0019	0.0026	0.0048	0.0000	0.0000	**0.0256**	**0.0259**	0.0030	0.0033	0.0044	0.0048	0.0174	0.0174	0.0174
27	JUR067	0.2550	0.1342	0.1256	0.1383	0.0122	0.0122	0.0019	0.0019	0.0019	0.0004	0.0026	0.0026	0.0019	0.0030	0.0030	0.0226	0.0230	0.0000	0.0026	0.0015	0.0019	0.0145	0.0145	0.0145
28	JUR069	0.2550	0.1342	0.1256	0.1390	0.0141	0.0141	0.0037	0.0037	0.0037	0.0022	0.0022	0.0022	0.0037	0.0026	0.0026	0.0245	0.0248	0.0019	0.0030	0.0033	0.0037	0.0163	0.0163	0.0163
29	LIN023	0.2550	0.1401	0.1323	0.1420	0.0222	0.0222	0.0234	0.0234	0.0234	0.0226	0.0248	0.0248	0.0226	**0.0252**	**0.0252**	0.0208	0.0211	0.0222	0.0248	0.0230	0.0234	0.0245	0.0245	0.0245
30	LIN025	0.2546	0.1394	0.1316	0.1412	0.0215	0.0215	0.0226	0.0226	0.0226	0.0219	0.0241	0.0241	0.0219	0.0245	0.0245	0.0200	0.0204	0.0215	0.0241	0.0222	0.0226	0.0237	0.0237	0.0237
31	MAC553	0.2546	0.1360	0.1290	0.1397	0.0059	0.0059	0.0163	0.0163	0.0163	0.0148	0.0170	0.0170	0.0163	0.0174	0.0174	**0.0252**	**0.0256**	0.0145	0.0163	0.0159	0.0163	0.0030	0.0030	0.0030
32	MAC561	0.2554	0.1349	0.1268	0.1383	0.0048	0.0048	0.0152	0.0152	0.0152	0.0137	0.0159	0.0159	0.0152	0.0163	0.0163	0.0230	0.0234	0.0133	0.0152	0.0141	0.0152	0.0063	0.0063	0.0063
33	MUC061	0.2543	0.1394	0.1308	0.1408	0.0208	0.0208	0.0215	0.0215	0.0215	0.0208	0.0230	0.0222	0.0215	0.0234	0.0234	0.0059	0.0063	0.0204	0.0230	0.0219	0.0215	0.0222	0.0222	0.0222
34	MUC072	0.2546	0.1394	0.1308	0.1408	0.0208	0.0208	0.0219	0.0219	0.0219	0.0211	0.0234	0.0226	0.0219	0.0237	0.0237	0.0059	0.0063	0.0208	0.0234	0.0222	0.0219	0.0222	0.0222	0.0222
35	NAT403	0.2546	0.1349	0.1264	0.1390	0.0148	0.0148	0.0044	0.0044	0.0044	0.0030	0.0015	0.0022	0.0044	0.0004	0.0004	**0.0252**	**0.0256**	0.0026	0.0030	0.0041	0.0044	0.0170	0.0170	0.0170
36	NAT405	0.2546	0.1349	0.1264	0.1390	0.0148	0.0148	0.0044	0.0044	0.0044	0.0030	0.0015	0.0022	0.0044	0.0004	0.0004	**0.0252**	**0.0256**	0.0026	0.0030	0.0041	0.0044	0.0170	0.0170	0.0170
37	PAG691	0.2543	0.1349	0.1249	0.1390	0.0148	0.0148	0.0044	0.0044	0.0044	0.0030	0.0030	0.0030	0.0044	0.0033	0.0033	0.0245	0.0248	0.0026	0.0015	0.0041	0.0044	0.0170	0.0170	0.0170
38	PAG692	0.2532	0.1338	0.1260	0.1386	0.0148	0.0148	0.0044	0.0044	0.0044	0.0022	0.0022	0.0030	0.0044	0.0033	0.0033	**0.0252**	**0.0256**	0.0026	0.0030	0.0041	0.0044	0.0170	0.0170	0.0170
39	PAG693	0.2543	0.1349	0.1249	0.1390	0.0148	0.0148	0.0044	0.0044	0.0044	0.0030	0.0030	0.0030	0.0044	0.0033	0.0033	0.0245	0.0248	0.0026	0.0015	0.0041	0.0044	0.0170	0.0170	0.0170
40	PAR527	0.2535	0.1349	0.1275	0.1383	0.0022	0.0022	0.0141	0.0141	0.0141	0.0126	0.0148	0.0148	0.0133	0.0152	0.0152	0.0230	0.0234	0.0122	0.0141	0.0137	0.0141	0.0059	0.0059	0.0059
41	PAR528	0.2535	0.1342	0.1268	0.1383	0.0015	0.0015	0.0133	0.0133	0.0133	0.0119	0.0133	0.0141	0.0126	0.0145	0.0145	0.0222	0.0226	0.0115	0.0133	0.0130	0.0133	0.0052	0.0052	0.0052
42	PAR529	0.2539	0.1338	0.1264	0.1379	0.0011	0.0011	0.0130	0.0130	0.0130	0.0115	0.0137	0.0137	0.0122	0.0141	0.0141	0.0219	0.0222	0.0111	0.0130	0.0126	0.0130	0.0048	0.0048	0.0048
43	PIC383	0.2524	0.1364	0.1271	0.1379	0.0089	0.0089	0.0133	0.0133	0.0133	0.0119	0.0133	0.0141	0.0133	0.0133	0.0133	0.0215	0.0219	0.0115	0.0141	0.0130	0.0133	0.0096	0.0096	0.0096
44	PIC384	0.2524	0.1364	0.1271	0.1379	0.0089	0.0089	0.0133	0.0133	0.0133	0.0119	0.0133	0.0141	0.0133	0.0133	0.0133	0.0215	0.0219	0.0115	0.0141	0.0130	0.0133	0.0096	0.0096	0.0096
45	PIQ4575	0.2546	0.1349	0.1264	0.1390	0.0148	0.0148	0.0044	0.0044	0.0044	0.0030	0.0015	0.0022	0.0044	0.0004	0.0004	**0.0252**	**0.0256**	0.0026	0.0030	0.0041	0.0044	0.0170	0.0170	0.0170
46	PIQ4580	0.2546	0.1349	0.1264	0.1390	0.0148	0.0148	0.0044	0.0044	0.0044	0.0030	0.0015	0.0022	0.0044	0.0004	0.0004	**0.0252**	**0.0256**	0.0026	0.0030	0.0041	0.0044	0.0170	0.0170	0.0170
47	PIR666	0.2543	0.1353	0.1268	0.1386	0.0130	0.0130	0.0026	0.0026	0.0026	0.0019	0.0041	0.0041	0.0026	0.0044	0.0044	0.0226	0.0230	0.0015	0.0041	0.0030	0.0026	0.0145	0.0145	0.0145
48	PIR670	0.2543	0.1353	0.1268	0.1386	0.0130	0.0130	0.0026	0.0026	0.0026	0.0019	0.0041	0.0041	0.0026	0.0044	0.0044	0.0226	0.0230	0.0015	0.0041	0.0030	0.0026	0.0145	0.0145	0.0145
49	PIR671	0.2543	0.1353	0.1268	0.1386	0.0130	0.0130	0.0026	0.0026	0.0026	0.0019	0.0041	0.0041	0.0026	0.0044	0.0044	0.0226	0.0230	0.0015	0.0041	0.0030	0.0026	0.0145	0.0145	0.0145
50	PRP082	0.2546	0.1349	0.1264	0.1390	0.0145	0.0145	0.0041	0.0041	0.0041	0.0026	0.0011	0.0019	0.0041	0.0007	0.0007	0.0248	0.0252	0.0022	0.0026	0.0037	0.0041	0.0167	0.0167	0.0167
51	PRP084	0.2561	0.1345	0.1260	0.1386	0.0137	0.0137	0.0033	0.0033	0.0033	0.0019	0.0041	0.0041	0.0033	0.0044	0.0044	0.0241	0.0245	0.0015	0.0041	0.0007	0.0033	0.0159	0.0159	0.0159
52	SAN496	0.2546	0.1338	0.1253	0.1379	0.0126	0.0126	0.0022	0.0022	0.0022	0.0000	0.0030	0.0030	0.0022	0.0033	0.0033	0.0230	0.0234	0.0004	0.0030	0.0019	0.0022	0.0148	0.0148	0.0148
53	SAN503	0.2546	0.1338	0.1253	0.1379	0.0126	0.0126	0.0022	0.0022	0.0022	0.0000	0.0030	0.0030	0.0022	0.0033	0.0033	0.0230	0.0234	0.0004	0.0030	0.0019	0.0022	0.0148	0.0148	0.0148
54	SFS600	0.2554	0.1364	0.1279	0.1397	0.0148	0.0148	0.0044	0.0044	0.0044	0.0037	0.0052	0.0052	0.0044	0.0056	0.0056	0.0245	0.0248	0.0033	0.0052	0.0048	0.0044	0.0163	0.0163	0.0163
55	SFS603	0.2539	0.1353	0.1268	0.1386	0.0137	0.0137	0.0033	0.0033	0.0033	0.0026	0.0048	0.0048	0.0033	0.0052	0.0052	0.0234	0.0237	0.0022	0.0048	0.0037	0.0033	0.0152	0.0152	0.0152
56	SFS604	0.2539	0.1353	0.1268	0.1386	0.0145	0.0145	0.0041	0.0041	0.0041	0.0033	0.0056	0.0056	0.0041	0.0059	0.0059	0.0241	0.0245	0.0030	0.0056	0.0044	0.0041	0.0159	0.0159	0.0159
57	SFS611	0.2550	0.1357	0.1271	0.1397	0.0145	0.0145	0.0041	0.0041	0.0041	0.0026	0.0019	0.0019	0.0041	0.0022	0.0022	0.0248	0.0252	0.0022	0.0026	0.0037	0.0041	0.0167	0.0167	0.0167
58	SJV795	0.2546	0.1360	0.1282	0.1390	0.0052	0.0052	0.0156	0.0156	0.0156	0.0141	0.0163	0.0163	0.0156	0.0167	0.0167	0.0245	0.0248	0.0137	0.0156	0.0152	0.0156	0.0022	0.0022	0.0022
59	SJV799	0.2546	0.1360	0.1282	0.1390	0.0052	0.0052	0.0156	0.0156	0.0156	0.0141	0.0163	0.0163	0.0156	0.0167	0.0167	0.0245	0.0248	0.0137	0.0156	0.0152	0.0156	0.0022	0.0022	0.0022
60	SLS621	0.2550	0.1353	0.1268	0.1394	0.0152	0.0152	0.0048	0.0048	0.0048	0.0033	0.0019	0.0026	0.0048	0.0000	0.0000	**0.0256**	**0.0259**	0.0030	0.0033	0.0044	0.0048	0.0174	0.0174	0.0174
61	SLS622	0.2550	0.1353	0.1268	0.1394	0.0152	0.0152	0.0048	0.0048	0.0048	0.0033	0.0019	0.0026	0.0048	0.0000	0.0000	**0.0256**	**0.0259**	0.0030	0.0033	0.0044	0.0048	0.0174	0.0174	0.0174
62	SUB718	0.2554	0.1353	0.1268	0.1390	0.0148	0.0148	0.0015	0.0015	0.0015	0.0030	0.0052	0.0052	0.0015	0.0056	0.0056	0.0245	0.0248	0.0026	0.0052	0.0041	0.0015	0.0170	0.0170	0.0170
63	SUB722	0.2557	0.1364	0.1279	0.1401	0.0148	0.0148	0.0015	0.0015	0.0015	0.0030	0.0044	0.0052	0.0015	0.0056	0.0056	0.0237	0.0241	0.0026	0.0052	0.0041	0.0015	0.0170	0.0170	0.0170
64	TAU485	0.2524	0.1371	0.1279	0.1390	0.0100	0.0100	0.0145	0.0145	0.0145	0.0130	0.0145	0.0152	0.0145	0.0137	0.0137	0.0226	0.0230	0.0126	0.0152	0.0141	0.0145	0.0107	0.0107	0.0107
65	TAU486	0.2532	0.1360	0.1275	0.1379	0.0111	0.0111	0.0156	0.0156	0.0156	0.0141	0.0156	0.0156	0.0156	0.0148	0.0148	0.0230	0.0234	0.0137	0.0163	0.0152	0.0156	0.0119	0.0119	0.0119
66	UBA390	0.2528	0.1360	0.1268	0.1379	0.0096	0.0096	0.0141	0.0141	0.0141	0.0126	0.0141	0.0148	0.0141	0.0141	0.0141	0.0222	0.0226	0.0122	0.0148	0.0137	0.0141	0.0104	0.0104	0.0104
67	UBA398	0.2520	0.1368	0.1275	0.1386	0.0096	0.0096	0.0141	0.0141	0.0141	0.0126	0.0141	0.0148	0.0141	0.0141	0.0141	0.0222	0.0226	0.0122	0.0148	0.0137	0.0141	0.0104	0.0104	0.0104

		25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
1	*E.electricus*																								
2	*G.carapo*																								
3	*G.silvius*																								
4	*G.pantanal*																								
5	ANG620																								
6	ANG658																								
7	ARI452																								
8	ARI454																								
9	ARI455																								
10	BER571																								
11	BER572																								
12	CAN456																								
13	CAN458																								
14	EMA128																								
15	EMA130																								
16	EUN007																								
17	EUN013																								
18	IGU472																								
19	IGU476																								
20	ITA747																								
21	ITA748																								
22	JAP537																								
23	JAP538																								
24	JAP539																								
25	JUQ520	0.0000																							
26	JUQ522	0.0030	0.0030																						
27	JUR067	0.0026	0.0026	0.0019																					
28	JUR069	**0.0252**	**0.0252**	0.0222	0.0241																				
29	LIN023	0.0245	0.0245	0.0215	0.0234	0.0007																			
30	LIN025	0.0174	0.0174	0.0145	0.0163	0.0245	0.0245																		
31	MAC553	0.0163	0.0163	0.0133	0.0152	0.0226	0.0219	0.0063																	
32	MAC561	0.0234	0.0234	0.0204	0.0222	0.0178	0.0170	0.0230	0.0208																
33	MUC061	0.0237	0.0237	0.0208	0.0226	0.0178	0.0170	0.0230	0.0208	0.0007															
34	MUC072	0.0004	0.0004	0.0026	0.0022	0.0248	0.0241	0.0170	0.0159	0.0230	0.0234														
35	NAT403	0.0004	0.0004	0.0026	0.0022	0.0248	0.0241	0.0170	0.0159	0.0230	0.0234	0.0000													
36	NAT405	0.0033	0.0033	0.0026	0.0030	0.0248	0.0241	0.0170	0.0156	0.0222	0.0226	0.0030	0.0030												
37	PAG691	0.0033	0.0033	0.0026	0.0022	0.0248	0.0241	0.0170	0.0159	0.0230	0.0234	0.0030	0.0030	0.0030											
38	PAG692	0.0033	0.0033	0.0026	0.0030	0.0248	0.0241	0.0170	0.0156	0.0222	0.0226	0.0030	0.0030	0.0000	0.0030										
39	PAG693	0.0033	0.0033	0.0026	0.0030	0.0248	0.0241	0.0170	0.0156	0.0222	0.0226	0.0030	0.0030	0.0000	0.0030	0.0030									
40	PAR527	0.0152	0.0152	0.0122	0.0141	0.0222	0.0215	0.0067	0.0056	0.0208	0.0208	0.0148	0.0148	0.0148	0.0148	0.0148									
41	PAR528	0.0145	0.0145	0.0115	0.0133	0.0215	0.0208	0.0059	0.0048	0.0200	0.0200	0.0141	0.0141	0.0141	0.0141	0.0141	0.0015								
42	PAR529	0.0141	0.0141	0.0111	0.0130	0.0211	0.0204	0.0056	0.0044	0.0196	0.0196	0.0137	0.0137	0.0137	0.0137	0.0137	0.0011	0.0004							
43	PIC383	0.0133	0.0133	0.0115	0.0133	0.0211	0.0204	0.0104	0.0100	0.0193	0.0193	0.0130	0.0130	0.0141	0.0141	0.0141	0.0089	0.0082	0.0078						
44	PIC384	0.0133	0.0133	0.0115	0.0133	0.0211	0.0204	0.0104	0.0100	0.0193	0.0193	0.0130	0.0130	0.0141	0.0141	0.0141	0.0089	0.0082	0.0078	0.0000					
45	PIQ4575	0.0004	0.0004	0.0026	0.0022	0.0248	0.0241	0.0170	0.0159	0.0230	0.0234	0.0000	0.0000	0.0030	0.0030	0.0030	0.0148	0.0141	0.0137	0.0130	0.0130				
46	PIQ4580	0.0004	0.0004	0.0026	0.0022	0.0248	0.0241	0.0170	0.0159	0.0230	0.0234	0.0000	0.0000	0.0030	0.0030	0.0030	0.0148	0.0141	0.0137	0.0130	0.0130	0.0000			
47	PIR666	0.0044	0.0044	0.0015	0.0033	0.0230	0.0222	0.0152	0.0141	0.0204	0.0208	0.0041	0.0041	0.0041	0.0041	0.0041	0.0130	0.0122	0.0119	0.0122	0.0122	0.0041	0.0041		
48	PIR670	0.0044	0.0044	0.0015	0.0033	0.0230	0.0222	0.0152	0.0141	0.0204	0.0208	0.0041	0.0041	0.0041	0.0041	0.0041	0.0130	0.0122	0.0119	0.0122	0.0122	0.0041	0.0041	0.0000	
49	PIR671	0.0044	0.0044	0.0015	0.0033	0.0230	0.0222	0.0152	0.0141	0.0204	0.0208	0.0041	0.0041	0.0041	0.0041	0.0041	0.0130	0.0122	0.0119	0.0122	0.0122	0.0041	0.0041	0.0000	0.0000
50	PRP082	0.0007	0.0007	0.0022	0.0019	0.0245	0.0237	0.0167	0.0156	0.0226	0.0230	0.0004	0.0004	0.0026	0.0026	0.0026	0.0145	0.0137	0.0133	0.0130	0.0130	0.0004	0.0004	0.0037	0.0037
51	PRP084	0.0044	0.0044	0.0015	0.0033	0.0230	0.0222	0.0159	0.0141	0.0219	0.0222	0.0041	0.0041	0.0041	0.0041	0.0041	0.0137	0.0130	0.0126	0.0130	0.0130	0.0041	0.0041	0.0030	0.0030
52	SAN496	0.0033	0.0033	0.0004	0.0022	0.0226	0.0219	0.0148	0.0137	0.0208	0.0211	0.0030	0.0030	0.0030	0.0022	0.0030	0.0126	0.0119	0.0115	0.0119	0.0119	0.0030	0.0030	0.0019	0.0019
53	SAN503	0.0033	0.0033	0.0004	0.0022	0.0226	0.0219	0.0148	0.0137	0.0208	0.0211	0.0030	0.0030	0.0030	0.0022	0.0030	0.0126	0.0119	0.0115	0.0119	0.0119	0.0030	0.0030	0.0019	0.0019
54	SFS600	0.0056	0.0056	0.0033	0.0052	0.0245	0.0237	0.0170	0.0159	0.0222	0.0226	0.0052	0.0052	0.0052	0.0052	0.0052	0.0148	0.0141	0.0137	0.0141	0.0141	0.0052	0.0052	0.0019	0.0019
55	SFS603	0.0052	0.0052	0.0022	0.0041	0.0237	0.0230	0.0159	0.0148	0.0211	0.0215	0.0048	0.0048	0.0048	0.0048	0.0048	0.0137	0.0130	0.0126	0.0126	0.0126	0.0048	0.0048	0.0007	0.0007
56	SFS604	0.0059	0.0059	0.0030	0.0048	0.0245	0.0237	0.0167	0.0156	0.0219	0.0222	0.0056	0.0056	0.0056	0.0056	0.0056	0.0145	0.0137	0.0133	0.0133	0.0133	0.0056	0.0056	0.0015	0.0015
57	SFS611	0.0022	0.0022	0.0022	0.0019	0.0245	0.0237	0.0167	0.0156	0.0226	0.0230	0.0019	0.0019	0.0026	0.0026	0.0026	0.0145	0.0137	0.0133	0.0137	0.0137	0.0019	0.0019	0.0037	0.0037
58	SJV795	0.0167	0.0167	0.0137	0.0156	0.0245	0.0237	0.0022	0.0056	0.0222	0.0222	0.0163	0.0163	0.0163	0.0163	0.0163	0.0059	0.0052	0.0048	0.0096	0.0096	0.0163	0.0163	0.0145	0.0145
59	SJV799	0.0167	0.0167	0.0137	0.0156	0.0245	0.0237	0.0022	0.0056	0.0222	0.0222	0.0163	0.0163	0.0163	0.0163	0.0163	0.0059	0.0052	0.0048	0.0096	0.0096	0.0163	0.0163	0.0145	0.0145
60	SLS621	0.0000	0.0000	0.0030	0.0026	**0.0252**	0.0245	0.0174	0.0163	0.0234	0.0237	0.0004	0.0004	0.0033	0.0033	0.0033	0.0152	0.0145	0.0141	0.0133	0.0133	0.0004	0.0004	0.0044	0.0044
61	SLS622	0.0000	0.0000	0.0030	0.0026	**0.0252**	0.0245	0.0174	0.0163	0.0234	0.0237	0.0004	0.0004	0.0033	0.0033	0.0033	0.0152	0.0145	0.0141	0.0133	0.0133	0.0004	0.0004	0.0044	0.0044
62	SUB718	0.0056	0.0056	0.0026	0.0044	0.0241	0.0234	0.0170	0.0159	0.0222	0.0226	0.0052	0.0052	0.0052	0.0052	0.0052	0.0148	0.0141	0.0137	0.0141	0.0141	0.0052	0.0052	0.0033	0.0033
63	SUB722	0.0056	0.0056	0.0026	0.0044	0.0241	0.0234	0.0170	0.0159	0.0215	0.0219	0.0052	0.0052	0.0052	0.0052	0.0052	0.0148	0.0133	0.0137	0.0141	0.0141	0.0052	0.0052	0.0033	0.0033
64	TAU485	0.0137	0.0137	0.0126	0.0145	0.0222	0.0222	0.0115	0.0111	0.0204	0.0204	0.0141	0.0141	0.0152	0.0152	0.0152	0.0100	0.0093	0.0089	0.0019	0.0019	0.0141	0.0141	0.0133	0.0133
65	TAU486	0.0148	0.0148	0.0137	0.0156	0.0241	0.0234	0.0126	0.0122	0.0208	0.0208	0.0152	0.0152	0.0163	0.0163	0.0163	0.0111	0.0104	0.0100	0.0030	0.0030	0.0152	0.0152	0.0145	0.0145
66	UBA390	0.0141	0.0141	0.0122	0.0141	0.0219	0.0211	0.0111	0.0107	0.0200	0.0200	0.0137	0.0137	0.0148	0.0148	0.0148	0.0096	0.0089	0.0085	0.0007	0.0007	0.0137	0.0137	0.0130	0.0130
67	UBA398	0.0141	0.0141	0.0122	0.0141	0.0226	0.0219	0.0111	0.0107	0.0200	0.0200	0.0137	0.0137	0.0148	0.0148	0.0148	0.0096	0.0089	0.0085	0.0022	0.0022	0.0137	0.0137	0.0130	0.0130

ANEXO 2
Distância p (não corrigida) entre as seqüências mitocondriais

	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
1 *E.electricus*																			
2 *G.carapo*																			
3 *G.silvius*																			
4 *G.pantanal*																			
5 ANG620																			
6 ANG658																			
7 ARI452																			
8 ARI454																			
9 ARI455																			
10 BER571																			
11 BER572																			
12 CAN456																			
13 CAN458																			
14 EMA128																			
15 EMA130																			
16 EUN007																			
17 EUN013																			
18 IGU472																			
19 IGU476																			
20 ITA747																			
21 ITA748																			
22 JAP537																			
23 JAP538																			
24 JAP539																			
25 JUQ520																			
26 JUQ522																			
27 JUR067																			
28 JUR069																			
29 LIN023																			
30 LIN025																			
31 MAC553																			
32 MAC561																			
33 MUC061																			
34 MUC072																			
35 NAT403																			
36 NAT405																			
37 PAG691																			
38 PAG692																			
39 PAG693																			
40 PAR527																			
41 PAR528																			
42 PAR529																			
43 PIC383																			
44 PIC384																			
45 PIQ4575																			
46 PIQ4580																			
47 PIR666																			
48 PIR670																			
49 PIR671																			
50 PRP082	0.0037																		
51 PRP084	0.0030	0.0037																	
52 SAN496	0.0019	0.0026	0.0019																
53 SAN503	0.0019	0.0026	0.0019	0.0000															
54 SFS600	0.0019	0.0048	0.0048	0.0037	0.0037														
55 SFS603	0.0007	0.0044	0.0037	0.0026	0.0026	0.0026													
56 SFS604	0.0015	0.0052	0.0044	0.0033	0.0033	0.0033	0.0007												
57 SFS611	0.0037	0.0015	0.0037	0.0026	0.0026	0.0048	0.0044	0.0052											
58 SJV795	0.0145	0.0159	0.0152	0.0141	0.0141	0.0163	0.0152	0.0159	0.0159										
59 SJV799	0.0145	0.0159	0.0152	0.0141	0.0141	0.0163	0.0152	0.0159	0.0159	0.0000									
60 SLS621	0.0044	0.0007	0.0044	0.0033	0.0033	0.0056	0.0052	0.0059	0.0022	0.0167	0.0167								
61 SLS622	0.0044	0.0007	0.0044	0.0033	0.0033	0.0056	0.0052	0.0059	0.0022	0.0167	0.0167	0.0000							
62 SUB718	0.0033	0.0048	0.0041	0.0030	0.0030	0.0052	0.0041	0.0048	0.0048	0.0163	0.0163	0.0056	0.0056						
63 SUB722	0.0033	0.0048	0.0041	0.0030	0.0030	0.0052	0.0041	0.0048	0.0048	0.0163	0.0163	0.0056	0.0056	0.0022					
64 TAU485	0.0133	0.0141	0.0141	0.0130	0.0130	0.0152	0.0137	0.0145	0.0148	0.0107	0.0107	0.0137	0.0137	0.0152	0.0152				
65 TAU486	0.0145	0.0152	0.0152	0.0141	0.0141	0.0163	0.0148	0.0156	0.0159	0.0119	0.0119	0.0148	0.0148	0.0163	0.0156	0.0019			
66 UBA390	0.0130	0.0137	0.0137	0.0126	0.0126	0.0148	0.0133	0.0141	0.0145	0.0104	0.0104	0.0141	0.0141	0.0148	0.0148	0.0019	0.0030		
67 UBA398	0.0130	0.0137	0.0137	0.0126	0.0126	0.0148	0.0137	0.0145	0.0145	0.0104	0.0104	0.0141	0.0141	0.0148	0.0148	0.0019	0.0030	0.0022	

ANEXO 3

Distância p (não corrigida) entre as seqüências nucleares

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	*E.electricus*																							
2	*G.carapo*	0.3111																						
3	*G.silvius*	0.3111	0.0248																					
4	*G.pantanal*	0.3130	0.0191	0.0248																				
5	ANG620	0.2920	0.0630	0.0611	0.0630																			
6	ANG658	0.2901	0.0630	0.0611	0.0630	0.0038																		
7	ARI452	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038																	
8	ARI454	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000																
9	ARI455	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000															
10	BER571	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000														
11	BER572	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000													
12	CAN456	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000												
13	CAN458	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000											
14	EMA128	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000										
15	EMA130	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000									
16	EUN007	0.2901	0.0592	0.0611	0.0611	0.0057	0.0057	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019								
17	EUN013	0.2901	0.0592	0.0611	0.0611	0.0057	0.0057	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0000							
18	IGU472	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019						
19	IGU476	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000					
20	ITA747	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000				
21	ITA748	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000			
22	JAP537	0.2958	0.0630	0.0630	0.0630	**0.0076**	**0.0076**	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038		
23	JAP538	0.2958	0.0630	0.0630	0.0630	**0.0076**	**0.0076**	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	
24	JAP539	0.2939	0.0611	0.0611	0.0611	0.0057	0.0057	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0038	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019
25	JUQ520	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
26	JUQ522	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
27	JUR067	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
28	JUR069	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
29	LIN023	0.2901	0.0592	0.0611	0.0611	0.0057	0.0057	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0057	0.0057
30	LIN025	0.2901	0.0592	0.0611	0.0611	0.0057	0.0057	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0057	0.0057
31	MAC553	0.2939	0.0611	0.0611	0.0611	0.0057	0.0057	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0038	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019
32	MAC561	0.2920	0.0630	0.0630	0.0630	**0.0076**	**0.0076**	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038
33	MUC061	0.2901	0.0592	0.0611	0.0611	0.0057	0.0057	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0057	0.0057
34	MUC072	0.2882	0.0611	0.0630	0.0630	**0.0076**	**0.0076**	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0019	0.0019	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	**0.0076**	**0.0076**
35	NAT403	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
36	NAT405	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
37	PAG691	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
38	PAG692	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
39	PAG693	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
40	PAR527	0.2920	0.0630	0.0611	0.0630	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	**0.0076**	**0.0076**
41	PAR528	0.2901	0.0630	0.0611	0.0630	0.0038	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	**0.0076**	**0.0076**
42	PAR529	0.2901	0.0630	0.0611	0.0630	0.0038	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	**0.0076**	**0.0076**
43	PIC383	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
44	PIC384	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
45	PIQ4575	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
46	PIQ4580	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
47	PIR666	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
48	PIR670	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
49	PIR671	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
50	PRP082	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
51	PRP084	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
52	SAN496	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
53	SAN503	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
54	SFS600	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
55	SFS603	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
56	SFS604	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
57	SFS611	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
58	SJV795	0.2939	0.0611	0.0611	0.0611	0.0057	0.0057	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0038	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019
59	SJV799	0.2920	0.0630	0.0630	0.0630	**0.0076**	**0.0076**	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038
60	SLS621	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
61	SLS622	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
62	SUB718	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
63	SUB722	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
64	TAU485	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
65	TAU486	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
66	UBA390	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038
67	UBA398	0.2920	0.0592	0.0592	0.0592	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038

		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
1	*E.electricus*																							
2	*G.carapo*																							
3	*G.silvius*																							
4	*G.pantanal*																							
5	ANG620																							
6	ANG658																							
7	ARI452																							
8	ARI454																							
9	ARI455																							
10	BER571																							
11	BER572																							
12	CAN456																							
13	CAN458																							
14	EMA128																							
15	EMA130																							
16	EUN007																							
17	EUN013																							
18	IGU472																							
19	IGU476																							
20	ITA747																							
21	ITA748																							
22	JAP537																							
23	JAP538																							
24	JAP539																							
25	JUQ520	0.0019																						
26	JUQ522	0.0019	0.0000																					
27	JUR067	0.0019	0.0000	0.0000																				
28	JUR069	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000																			
29	LIN023	0.0038	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019																		
30	LIN025	0.0038	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0000																	
31	MAC553	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0038																
32	MAC561	0.0019	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0019															
33	MUC061	0.0038	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000	0.0038	0.0057														
34	MUC072	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0019	0.0019	0.0057	**0.0076**	0.0019													
35	NAT403	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038												
36	NAT405	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000											
37	PAG691	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000										
38	PAG692	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000									
39	PAG693	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000								
40	PAR527	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0057	0.0076	0.0057	**0.0076**	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038							
41	PAR528	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0057	**0.0076**	0.0057	**0.0076**	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038						
42	PAR529	0.0057	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0057	**0.0076**	0.0057	**0.0076**	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000					
43	PIC383	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038				
44	PIC384	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000			
45	PIQ4575	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000		
46	PIQ4580	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	
47	PIR666	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
48	PIR670	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
49	PIR671	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
50	PRP082	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
51	PRP084	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
52	SAN496	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
53	SAN503	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
54	SFS600	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
55	SFS603	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
56	SFS604	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
57	SFS611	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
58	SJV795	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0038	0.0000	0.0019	0.0038	0.0057	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0057	0.0057	0.0057	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019
59	SJV799	0.0019	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0057	0.0057	0.0019	0.0000	0.0057	**0.0076**	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	**0.0076**	**0.0076**	**0.0076**	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038
60	SLS621	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
61	SLS622	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
62	SUB718	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
63	SUB722	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
64	TAU485	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
65	TAU486	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
66	UBA390	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
67	UBA398	0.0019	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0019	0.0019	0.0038	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0038	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
1 *E.electricus*																					
2 *G.carapo*																					
3 *G.silvius*																					
4 *G.pantanal*																					
5 ANG620																					
6 ANG658																					
7 ARI452																					
8 ARI454																					
9 ARI455																					
10 BER571																					
11 BER572																					
12 CAN456																					
13 CAN458																					
14 EMA128																					
15 EMA130																					
16 EUN007																					
17 EUN013																					
18 IGU472																					
19 IGU476																					
20 ITA747																					
21 ITA748																					
22 JAP537																					
23 JAP538																					
24 JAP539																					
25 JUQ520																					
26 JUQ522																					
27 JUR067																					
28 JUR069																					
29 LIN023																					
30 LIN025																					
31 MAC553																					
32 MAC561																					
33 MUC061																					
34 MUC072																					
35 NAT403																					
36 NAT405																					
37 PAG691																					
38 PAG692																					
39 PAG693																					
40 PAR527																					
41 PAR528																					
42 PAR529																					
43 PIC383																					
44 PIC384																					
45 PIQ4575																					
46 PIQ4580																					
47 PIR666																					
48 PIR670	0.0000																				
49 PIR671	0.0000	0.0000																			
50 PRP082	0.0000	0.0000	0.0000																		
51 PRP084	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000																	
52 SAN496	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000																
53 SAN503	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000															
54 SFS600	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000														
55 SFS603	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000													
56 SFS604	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000												
57 SFS611	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000											
58 SJV795	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019										
59 SJV799	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0019									
60 SLS621	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0038								
61 SLS622	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0038	0.0000							
62 SUB718	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000						
63 SUB722	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000					
64 TAU485	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000				
65 TAU486	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
66 UBA390	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
67 UBA398	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	

		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	*E.electricus*																							
2	*G.carapo*																							
3	*G.silvius*																							
4	*G.pantanal*																							
5	**ANG620**	0.0006																						
6	**ANG658**	0.0124	0.0124																					
7	**ARI452**	0.0124	0.0124	0.0000																				
8	**ARI454**	0.0124	0.0124	0.0000	0.0000																			
9	**ARI455**	0.0124	0.0124	0.0000	0.0019	0.0019																		
10	**BER571**	0.0112	0.0112	0.0019	0.0019	0.0037	0.0025																	
11	**BER572**	0.0130	0.0130	0.0037	0.0037	0.0037	0.0025	0.0019																
12	**CAN456**	0.0130	0.0130	0.0037	0.0037	0.0037	0.0025	0.0025	0.0037															
13	**CAN458**	0.0118	0.0118	0.0006	0.0006	0.0006	0.0019	0.0037	0.0037															
14	**EMA128**	0.0133	0.0133	0.0040	0.0040	0.0040	0.0028	0.0016	0.0022	0.0040	0.0000													
15	**EMA130**	0.0133	0.0133	0.0040	0.0040	0.0040	0.0028	0.0016	0.0022	0.0040	0.0217	0.0217												
16	**EUN007**	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202	0.0196	0.0214	0.0208	0.0202	**0.0220**	**0.0220**	0.0003											
17	**EUN013**	0.0205	0.0205	0.0205	0.0205	0.0205	0.0199	0.0217	0.0211	0.0205	0.0025	0.0025	0.0192	0.0196										
18	**IGU472**	0.0109	0.0109	0.0016	0.0016	0.0016	0.0003	0.0022	0.0022	0.0016	0.0025	0.0025	0.0214	0.0217	0.0022									
19	**IGU476**	0.0124	0.0124	0.0037	0.0037	0.0037	0.0025	0.0025	0.0025	0.0037	0.0028	0.0028	0.0214	0.0217	0.0022									
20	**ITA747**	0.0121	0.0121	0.0028	0.0028	0.0028	0.0016	0.0034	0.0034	0.0028	0.0037	0.0037	0.0205	0.0205	0.0208	0.0034								
21	**ITA748**	0.0124	0.0124	0.0006	0.0006	0.0006	0.0019	0.0037	0.0037	0.0006	0.0040	0.0040	0.0202	0.0205	0.0016	0.0037	0.0028							
22	**JAP537**	0.0056	0.0056	0.0143	0.0143	0.0143	0.0130	0.0149	0.0149	0.0137	0.0152	0.0152	0.0214	0.0217	0.0127	0.0143	0.0140	0.0143						
23	**JAP538**	0.0056	0.0056	0.0143	0.0143	0.0143	0.0130	0.0149	0.0149	0.0137	0.0152	0.0152	0.0214	0.0217	0.0127	0.0143	0.0140	0.0140	0.0000					
24	**JAP539**	0.0053	0.0053	0.0140	0.0140	0.0140	0.0127	0.0146	0.0146	0.0133	0.0149	0.0149	0.0211	0.0214	0.0124	0.0140	0.0137	0.0140	0.0003	0.0003				
25	**JUQ520**	0.0133	0.0133	0.0040	0.0040	0.0040	0.0028	0.0016	0.0022	0.0040	0.0000	0.0000	0.0217	**0.0220**	0.0025	0.0028	0.0037	0.0040	0.0152	0.0152	0.0149			
26	**JUQ522**	0.0133	0.0133	0.0040	0.0040	0.0040	0.0028	0.0016	0.0022	0.0040	0.0000	0.0000	0.0217	**0.0220**	0.0025	0.0028	0.0037	0.0040	0.0152	0.0152	0.0149	0.0000		
27	**JUR067**	0.0109	0.0109	0.0016	0.0016	0.0016	0.0003	0.0022	0.0022	0.0016	0.0025	0.0025	0.0192	0.0196	0.0000	0.0022	0.0012	0.0016	0.0127	0.0127	0.0124	0.0025	0.0025	
28	**JUR069**	0.0124	0.0124	0.0031	0.0031	0.0031	0.0019	0.0019	0.0019	0.0031	0.0022	0.0022	0.0208	0.0211	0.0016	0.0025	0.0028	0.0031	0.0143	0.0143	0.0140	0.0022	0.0022	0.0016
29	**LIN023**	0.0196	0.0196	0.0199	0.0199	0.0199	0.0192	0.0211	0.0211	0.0192	0.0214	0.0214	0.0174	0.0177	0.0189	0.0211	0.0196	0.0199	0.0214	0.0214	0.0211	0.0214	0.0214	0.0189
30	**LIN025**	0.0189	0.0189	0.0192	0.0192	0.0192	0.0186	0.0205	0.0205	0.0186	0.0208	0.0208	0.0168	0.0171	0.0183	0.0205	0.0189	0.0192	0.0208	0.0208	0.0205	0.0208	0.0208	0.0183
31	**MAC553**	0.0059	0.0059	0.0140	0.0140	0.0140	0.0127	0.0146	0.0146	0.0140	0.0149	0.0149	0.0217	**0.0220**	0.0124	0.0140	0.0137	0.0140	0.0028	0.0028	0.0025	0.0149	0.0149	0.0124
32	**MAC561**	0.0053	0.0053	0.0133	0.0133	0.0133	0.0121	0.0140	0.0140	0.0133	0.0143	0.0143	0.0202	0.0205	0.0118	0.0133	0.0124	0.0133	0.0059	0.0059	0.0056	0.0143	0.0143	0.0118
33	**MUC061**	0.0183	0.0183	0.0183	0.0183	0.0183	0.0177	0.0196	0.0189	0.0183	0.0199	0.0199	0.0050	0.0053	0.0174	0.0196	0.0186	0.0183	0.0196	0.0196	0.0192	0.0199	0.0199	0.0174
34	**MUC072**	0.0186	0.0186	0.0189	0.0189	0.0189	0.0183	0.0202	0.0196	0.0189	0.0205	0.0205	0.0053	0.0056	0.0180	0.0202	0.0192	0.0189	0.0199	0.0199	0.0196	0.0205	0.0205	0.0180
35	**NAT403**	0.0130	0.0130	0.0037	0.0037	0.0037	0.0025	0.0012	0.0019	0.0037	0.0003	0.0003	0.0214	0.0217	0.0022	0.0025	0.0034	0.0037	0.0149	0.0149	0.0146	0.0003	0.0003	0.0022
36	**NAT405**	0.0130	0.0130	0.0037	0.0037	0.0037	0.0025	0.0012	0.0019	0.0037	0.0003	0.0003	0.0214	0.0217	0.0022	0.0025	0.0034	0.0037	0.0149	0.0149	0.0146	0.0003	0.0003	0.0022
37	**PAG691**	0.0130	0.0130	0.0037	0.0037	0.0037	0.0025	0.0025	0.0025	0.0037	0.0028	0.0028	0.0208	0.0211	0.0022	0.0012	0.0034	0.0037	0.0149	0.0149	0.0146	0.0028	0.0028	0.0022
38	**PAG692**	0.0130	0.0130	0.0037	0.0037	0.0037	0.0019	0.0019	0.0025	0.0037	0.0028	0.0028	0.0214	0.0217	0.0022	0.0025	0.0034	0.0037	0.0149	0.0149	0.0146	0.0028	0.0028	0.0022
39	**PAG693**	0.0130	0.0130	0.0037	0.0037	0.0037	0.0025	0.0025	0.0025	0.0037	0.0028	0.0028	0.0208	0.0211	0.0022	0.0012	0.0034	0.0037	0.0149	0.0149	0.0146	0.0028	0.0028	0.0022
40	**PAR527**	0.0019	0.0025	0.0124	0.0124	0.0124	0.0112	0.0130	0.0130	0.0118	0.0133	0.0133	0.0202	0.0205	0.0109	0.0124	0.0121	0.0124	0.0062	0.0062	0.0059	0.0133	0.0133	0.0109
41	**PAR528**	0.0019	0.0012	0.0118	0.0118	0.0118	0.0106	0.0118	0.0124	0.0112	0.0127	0.0127	0.0196	0.0199	0.0102	0.0118	0.0115	0.0118	0.0056	0.0056	0.0053	0.0127	0.0127	0.0102
42	**PAR529**	0.0016	0.0009	0.0115	0.0115	0.0115	0.0102	0.0121	0.0121	0.0109	0.0124	0.0124	0.0192	0.0196	0.0099	0.0115	0.0112	0.0115	0.0053	0.0053	0.0050	0.0124	0.0124	0.0099
43	**PIC383**	0.0081	0.0081	0.0112	0.0112	0.0112	0.0099	0.0112	0.0118	0.0112	0.0112	0.0112	0.0183	0.0186	0.0096	0.0118	0.0109	0.0112	0.0087	0.0087	0.0084	0.0112	0.0112	0.0096
44	**PIC384**	0.0081	0.0081	0.0112	0.0112	0.0112	0.0099	0.0112	0.0118	0.0112	0.0112	0.0112	0.0183	0.0186	0.0096	0.0118	0.0109	0.0112	0.0087	0.0087	0.0084	0.0112	0.0112	0.0096
45	**PIQ4575**	0.0130	0.0130	0.0037	0.0037	0.0037	0.0025	0.0012	0.0019	0.0037	0.0003	0.0003	0.0214	0.0217	0.0022	0.0025	0.0034	0.0037	0.0149	0.0149	0.0146	0.0003	0.0003	0.0022
46	**PIQ4580**	0.0130	0.0130	0.0037	0.0037	0.0037	0.0025	0.0012	0.0019	0.0037	0.0003	0.0003	0.0214	0.0217	0.0022	0.0025	0.0034	0.0037	0.0149	0.0149	0.0146	0.0003	0.0003	0.0022
47	**PIR666**	0.0115	0.0115	0.0022	0.0022	0.0022	0.0016	0.0034	0.0034	0.0022	0.0037	0.0037	0.0192	0.0196	0.0012	0.0034	0.0025	0.0022	0.0127	0.0127	0.0124	0.0037	0.0037	0.0012
48	**PIR670**	0.0115	0.0115	0.0022	0.0022	0.0022	0.0016	0.0034	0.0034	0.0022	0.0037	0.0037	0.0192	0.0196	0.0012	0.0034	0.0025	0.0022	0.0127	0.0127	0.0124	0.0037	0.0037	0.0012
49	**PIR671**	0.0115	0.0115	0.0022	0.0022	0.0022	0.0016	0.0034	0.0034	0.0022	0.0037	0.0037	0.0192	0.0196	0.0012	0.0034	0.0025	0.0022	0.0127	0.0127	0.0124	0.0037	0.0037	0.0012
50	**PRP082**	0.0127	0.0127	0.0034	0.0034	0.0034	0.0022	0.0009	0.0016	0.0034	0.0006	0.0006	0.0211	0.0214	0.0019	0.0022	0.0031	0.0034	0.0127	0.0127	0.0124	0.0006	0.0006	0.0019
51	**PRP084**	0.0121	0.0121	0.0028	0.0028	0.0028	0.0016	0.0034	0.0034	0.0028	0.0037	0.0037	0.0205	0.0208	0.0012	0.0034	0.0006	0.0028	0.0140	0.0140	0.0137	0.0037	0.0037	0.0012
52	**SAN496**	0.0112	0.0112	0.0019	0.0019	0.0019	0.0000	0.0025	0.0025	0.0019	0.0028	0.0028	0.0196	0.0199	0.0003	0.0025	0.0016	0.0019	0.0130	0.0130	0.0127	0.0028	0.0028	0.0003
53	**SAN503**	0.0112	0.0112	0.0019	0.0019	0.0019	0.0000	0.0025	0.0025	0.0019	0.0028	0.0028	0.0196	0.0199	0.0003	0.0025	0.0016	0.0019	0.0130	0.0130	0.0127	0.0028	0.0028	0.0003
54	**SFS600**	0.0130	0.0130	0.0037	0.0037	0.0037	0.0031	0.0043	0.0043	0.0037	0.0047	0.0047	0.0208	0.0211	0.0028	0.0043	0.0040	0.0037	0.0143	0.0143	0.0140	0.0047	0.0047	0.0028
55	**SFS603**	0.0121	0.0121	0.0028	0.0028	0.0028	0.0022	0.0040	0.0040	0.0028	0.0043	0.0043	0.0199	0.0202	0.0019	0.0040	0.0031	0.0028	0.0133	0.0133	0.0130	0.0043	0.0043	0.0019
56	**SFS604**	0.0127	0.0127	0.0034	0.0034	0.0034	0.0028	0.0047	0.0047	0.0034	0.0050	0.0050	0.0205	0.0208	0.0025	0.0047	0.0037	0.0034	0.0140	0.0140	0.0137	0.0050	0.0050	0.0025
57	**SFS611**	0.0127	0.0127	0.0034	0.0034	0.0034	0.0022	0.0016	0.0016	0.0034	0.0019	0.0019	0.0211	0.0214	0.0019	0.0022	0.0031	0.0034	0.0146	0.0146	0.0143	0.0019	0.0019	0.0019
58	**SJV795**	0.0053	0.0053	0.0133	0.0133	0.0133	0.0121	0.0140	0.0140	0.0133	0.0143	0.0143	0.0211	0.0214	0.0118	0.0133	0.0130	0.0133	0.0022	0.0022	0.0019	0.0143	0.0143	0.0118
59	**SJV799**	0.0056	0.0056	0.0137	0.0137	0.0137	0.0124	0.0143	0.0143	0.0137	0.0146	0.0146	0.0214	0.0217	0.0121	0.0137	0.0133	0.0137	0.0025	0.0025	0.0022	0.0146	0.0146	0.0121
60	**SLS621**	0.0133	0.0133	0.0040	0.0040	0.0040	0.0028	0.0016	0.0022	0.0040	0.0000	0.0000	0.0217	**0.0220**	0.0025	0.0028	0.0037	0.0040	0.0152	0.0152	0.0149	0.0000	0.0000	0.0025
61	**SLS622**	0.0133	0.0133	0.0040	0.0040	0.0040	0.0028	0.0016	0.0022	0.0040	0.0000	0.0000	0.0217	**0.0220**	0.0025	0.0028	0.0037	0.0040	0.0152	0.0152	0.0149	0.0000	0.0000	0.0025
62	**SUB718**	0.0130	0.0130	0.0012	0.0012	0.0012	0.0025	0.0043	0.0043	0.0012	0.0047	0.0047	0.0208	0.0211	0.0022	0.0043	0.0034	0.0012	0.0149	0.0149	0.0146	0.0047	0.0047	0.0022
63	**SUB722**	0.0130	0.0130	0.0012	0.0012	0.0012	0.0025	0.0037	0.0043	0.0012	0.0047	0.0047	0.0202	0.0205	0.0022	0.0043	0.0034	0.0012	0.0149	0.0149	0.0146	0.0047	0.0047	0.0022
64	**TAU485**	0.0090	0.0090	0.0121	0.0121	0.0121	0.0109	0.0121	0.0127	0.0121	0.0115	0.0115	0.0192	0.0196	0.0106	0.0127	0.0118	0.0121	0.0096	0.0096	0.0093	0.0115	0.0115	0.0106
65	**TAU486**	0.0099	0.0099	0.0130	0.0130	0.0130	0.0118	0.0130	0.0130	0.0130	0.0124	0.0124	0.0196	0.0199	0.0115	0.0137	0.0127	0.0130	0.0106	0.0106	0.0102	0.0124	0.0124	0.0115
66	**UBA390**	0.0087	0.0087	0.0118	0.0118	0.0118	0.0106	0.0118	0.0124	0.0118	0.0118	0.0118	0.0189	0.0192	0.0102	0.0124	0.0115	0.0118	0.0093	0.0093	0.0090	0.0118	0.0118	0.0102
67	**UBA398**	0.0087	0.0087	0.0118	0.0118	0.0118	0.0106	0.0118	0.0124	0.0118	0.0118	0.0118	0.0189	0.0192	0.0102	0.0124	0.0115	0.0118	0.0093	0.0093	0.0090	0.0118	0.0118	0.0102

		28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
1	*E.electricus*																							
2	*G.carapo*																							
3	*G.silvius*																							
4	*G.pantanal*																							
5	ANG620																							
6	ANG658																							
7	ARI452																							
8	ARI454																							
9	ARI455																							
10	BER571																							
11	BER572																							
12	CAN456																							
13	CAN458																							
14	EMA128																							
15	EMA130																							
16	EUN007																							
17	EUN013																							
18	IGU472																							
19	IGU476																							
20	ITA747																							
21	ITA748																							
22	JAP537																							
23	JAP538																							
24	JAP539																							
25	JUQ520																							
26	JUQ522																							
27	JUR067																							
28	JUR069	0.0205																						
29	LIN023	0.0199	0.0006																					
30	LIN025	0.0140	0.0211	0.0211																				
31	MAC553	0.0133	0.0199	0.0192	0.0056																			
32	MAC561	0.0189	0.0149	0.0143	0.0199	0.0183																		
33	MUC061	0.0196	0.0152	0.0146	0.0202	0.0186	0.0009																	
34	MUC072	0.0019	0.0211	0.0205	0.0146	0.0140	0.0196	0.0202																
35	NAT403	0.0019	0.0211	0.0205	0.0146	0.0140	0.0196	0.0202	0.0000															
36	NAT405	0.0025	0.0211	0.0205	0.0146	0.0137	0.0189	0.0196	0.0025	0.0025														
37	PAG691	0.0019	0.0211	0.0205	0.0146	0.0140	0.0196	0.0202	0.0025	0.0025	0.0025													
38	PAG692	0.0025	0.0211	0.0205	0.0146	0.0137	0.0189	0.0196	0.0025	0.0025	0.0000	0.0025												
39	PAG693	0.0124	0.0196	0.0189	0.0065	0.0059	0.0183	0.0186	0.0130	0.0130	0.0130	0.0130	0.0130											
40	PAR527	0.0118	0.0189	0.0183	0.0059	0.0053	0.0177	0.0180	0.0124	0.0124	0.0124	0.0124	0.0124	0.0019										
41	PAR528	0.0115	0.0186	0.0180	0.0056	0.0050	0.0174	0.0177	0.0121	0.0121	0.0121	0.0121	0.0121	0.0016	0.0003									
42	PAR529	0.0112	0.0180	0.0174	0.0090	0.0090	0.0164	0.0168	0.0109	0.0109	0.0118	0.0118	0.0118	0.0081	0.0074	0.0071								
43	PIC383	0.0112	0.0180	0.0174	0.0090	0.0090	0.0164	0.0168	0.0109	0.0109	0.0118	0.0118	0.0118	0.0081	0.0074	0.0071	0.0000							
44	PIC384	0.0019	0.0211	0.0205	0.0146	0.0140	0.0196	0.0202	0.0000	0.0000	0.0025	0.0025	0.0025	0.0130	0.0124	0.0121	0.0109	0.0109						
45	PIQ4575	0.0019	0.0211	0.0205	0.0146	0.0140	0.0196	0.0202	0.0000	0.0000	0.0025	0.0025	0.0025	0.0130	0.0124	0.0121	0.0109	0.0109	0.0000					
46	PIQ4580	0.0028	0.0196	0.0189	0.0130	0.0124	0.0174	0.0180	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0115	0.0109	0.0106	0.0102	0.0102	0.0034	0.0034				
47	PIR666	0.0028	0.0196	0.0189	0.0130	0.0124	0.0174	0.0180	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0115	0.0109	0.0106	0.0102	0.0102	0.0034	0.0034	0.0000			
48	PIR670	0.0028	0.0196	0.0189	0.0130	0.0124	0.0174	0.0180	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0115	0.0109	0.0106	0.0102	0.0102	0.0034	0.0034	0.0000	0.0000		
49	PIR671	0.0028	0.0196	0.0189	0.0130	0.0124	0.0174	0.0180	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0115	0.0109	0.0106	0.0102	0.0102	0.0034	0.0034	0.0000	0.0000	0.0031	
50	PRP082	0.0016	0.0208	0.0202	0.0143	0.0137	0.0192	0.0199	0.0003	0.0003	0.0022	0.0022	0.0022	0.0127	0.0121	0.0118	0.0109	0.0109	0.0003	0.0003	0.0031	0.0031	0.0025	0.0031
51	PRP084	0.0028	0.0196	0.0189	0.0137	0.0124	0.0186	0.0192	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0034	0.0121	0.0115	0.0112	0.0109	0.0109	0.0034	0.0034	0.0025	0.0025	0.0025	0.0022
52	SAN496	0.0019	0.0192	0.0186	0.0127	0.0121	0.0177	0.0183	0.0025	0.0025	0.0025	0.0019	0.0025	0.0112	0.0106	0.0102	0.0099	0.0099	0.0025	0.0025	0.0016	0.0016	0.0016	0.0022
53	SAN503	0.0019	0.0192	0.0186	0.0127	0.0121	0.0177	0.0183	0.0025	0.0025	0.0025	0.0019	0.0025	0.0112	0.0106	0.0102	0.0099	0.0099	0.0025	0.0025	0.0016	0.0016	0.0016	0.0022
54	SFS600	0.0043	0.0208	0.0202	0.0146	0.0140	0.0189	0.0196	0.0043	0.0043	0.0043	0.0043	0.0043	0.0130	0.0124	0.0121	0.0118	0.0118	0.0043	0.0043	0.0016	0.0016	0.0016	0.0040
55	SFS603	0.0034	0.0202	0.0196	0.0137	0.0130	0.0180	0.0186	0.0040	0.0040	0.0040	0.0040	0.0040	0.0121	0.0115	0.0112	0.0106	0.0106	0.0040	0.0040	0.0006	0.0006	0.0006	0.0037
56	SFS604	0.0040	0.0208	0.0202	0.0143	0.0137	0.0186	0.0192	0.0047	0.0047	0.0047	0.0047	0.0047	0.0127	0.0121	0.0118	0.0112	0.0112	0.0047	0.0047	0.0012	0.0012	0.0012	0.0043
57	SFS611	0.0016	0.0208	0.0202	0.0143	0.0137	0.0192	0.0199	0.0016	0.0016	0.0022	0.0022	0.0022	0.0127	0.0121	0.0118	0.0115	0.0115	0.0016	0.0016	0.0031	0.0031	0.0031	0.0012
58	SJV795	0.0133	0.0211	0.0205	0.0019	0.0050	0.0192	0.0196	0.0140	0.0140	0.0140	0.0140	0.0140	0.0059	0.0053	0.0050	0.0084	0.0084	0.0140	0.0140	0.0124	0.0124	0.0124	0.0137
59	SJV799	0.0137	0.0214	0.0208	0.0022	0.0047	0.0196	0.0199	0.0143	0.0143	0.0143	0.0143	0.0143	0.0062	0.0056	0.0053	0.0087	0.0087	0.0143	0.0143	0.0127	0.0127	0.0127	0.0140
60	SLS621	0.0022	0.0214	0.0208	0.0149	0.0143	0.0199	0.0205	0.0003	0.0003	0.0028	0.0028	0.0028	0.0133	0.0127	0.0124	0.0112	0.0112	0.0003	0.0003	0.0037	0.0037	0.0037	0.0006
61	SLS622	0.0022	0.0214	0.0208	0.0149	0.0143	0.0199	0.0205	0.0003	0.0003	0.0028	0.0028	0.0028	0.0133	0.0127	0.0124	0.0112	0.0112	0.0003	0.0003	0.0037	0.0037	0.0037	0.0006
62	SUB718	0.0037	0.0205	0.0199	0.0146	0.0140	0.0189	0.0196	0.0043	0.0043	0.0043	0.0043	0.0043	0.0130	0.0124	0.0121	0.0118	0.0118	0.0043	0.0043	0.0028	0.0028	0.0028	0.0040
63	SUB722	0.0037	0.0205	0.0199	0.0146	0.0140	0.0183	0.0189	0.0043	0.0043	0.0043	0.0043	0.0043	0.0130	0.0118	0.0121	0.0118	0.0118	0.0043	0.0043	0.0028	0.0028	0.0028	0.0040
64	TAU485	0.0121	0.0189	0.0189	0.0099	0.0099	0.0174	0.0177	0.0118	0.0118	0.0127	0.0127	0.0127	0.0090	0.0084	0.0081	0.0016	0.0016	0.0118	0.0118	0.0112	0.0112	0.0112	0.0118
65	TAU486	0.0130	0.0205	0.0199	0.0109	0.0109	0.0177	0.0180	0.0127	0.0127	0.0137	0.0137	0.0137	0.0099	0.0093	0.0090	0.0025	0.0025	0.0127	0.0127	0.0121	0.0121	0.0121	0.0127
66	UBA390	0.0118	0.0186	0.0180	0.0096	0.0096	0.0171	0.0174	0.0115	0.0115	0.0124	0.0124	0.0124	0.0087	0.0081	0.0078	0.0006	0.0006	0.0115	0.0115	0.0109	0.0109	0.0109	0.0115
67	UBA398	0.0118	0.0192	0.0186	0.0096	0.0096	0.0171	0.0174	0.0115	0.0115	0.0124	0.0124	0.0124	0.0087	0.0081	0.0078	0.0019	0.0019	0.0115	0.0115	0.0109	0.0109	0.0109	0.0115

ANEXO 4

Distância p (não corrigida) para os dados mitocondrial e nuclear concatenados

		51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
1	*E.electricus*																	
2	*G.carapo*																	
3	*G.silvius*																	
4	*G.pantanal*																	
5	ANG620																	
6	ANG658																	
7	ARI452																	
8	ARI454																	
9	ARI455																	
10	BER571																	
11	BER572																	
12	CAN456																	
13	CAN458																	
14	EMA128																	
15	EMA130																	
16	EUN007																	
17	EUN013																	
18	IGU472																	
19	IGU476																	
20	ITA747																	
21	ITA748																	
22	JAP537																	
23	JAP538																	
24	JAP539																	
25	JUQ520																	
26	JUQ522																	
27	JUR067																	
28	JUR069																	
29	LIN023																	
30	LIN025																	
31	MAC553																	
32	MAC561																	
33	MUC061																	
34	MUC072																	
35	NAT403																	
36	NAT405																	
37	PAG691																	
38	PAG692																	
39	PAG693																	
40	PAR527																	
41	PAR528																	
42	PAR529																	
43	PIC383																	
44	PIC384																	
45	PIQ4575																	
46	PIQ4580																	
47	PIR666																	
48	PIR670																	
49	PIR671																	
50	PRP082																	
51	PRP084																	
52	SAN496	0.0016																
53	SAN503	0.0016	0.0000															
54	SFS600	0.0040	0.0031	0.0031														
55	SFS603	0.0031	0.0022	0.0022	0.0022													
56	SFS604	0.0037	0.0028	0.0028	0.0028	0.0006												
57	SFS611	0.0031	0.0022	0.0022	0.0040	0.0037	0.0043											
58	SJV795	0.0130	0.0121	0.0121	0.0140	0.0130	0.0137	0.0137										
59	SJV799	0.0133	0.0124	0.0124	0.0143	0.0133	0.0140	0.0140	0.0003									
60	SLS621	0.0037	0.0028	0.0028	0.0047	0.0043	0.0050	0.0019	0.0143	0.0146								
61	SLS622	0.0037	0.0028	0.0028	0.0047	0.0043	0.0050	0.0019	0.0143	0.0146	0.0000							
62	SUB718	0.0034	0.0025	0.0025	0.0043	0.0034	0.0040	0.0040	0.0140	0.0143	0.0047	0.0047						
63	SUB722	0.0034	0.0025	0.0025	0.0043	0.0034	0.0040	0.0040	0.0140	0.0143	0.0047	0.0047	0.0019					
64	TAU485	0.0118	0.0109	0.0109	0.0127	0.0115	0.0121	0.0124	0.0093	0.0096	0.0115	0.0115	0.0127	0.0127				
65	TAU486	0.0127	0.0118	0.0118	0.0137	0.0124	0.0130	0.0133	0.0102	0.0106	0.0124	0.0124	0.0137	0.0130	0.0016			
66	UBA390	0.0115	0.0106	0.0106	0.0124	0.0112	0.0118	0.0121	0.0090	0.0093	0.0118	0.0118	0.0124	0.0124	0.0016	0.0025		
67	UBA398	0.0115	0.0106	0.0106	0.0124	0.0115	0.0121	0.0121	0.0090	0.0093	0.0118	0.0118	0.0124	0.0124	0.0016	0.0025	0.0019	

ANEXO 5

Distância p (não corrigida) entre os haplótipos mitocondriais de Gymnotus pantherinus

	Hap 1	Hap 2	Hap 3	Hap 4	Hap 5	Hap 6	Hap 7	Hap 8	Hap 9	Hap 10	Hap 11	Hap 12	Hap 13	Hap 14	Hap 15	Hap 16	Hap 17	Hap 18	Hap 19	Hap 20
Hap 1																				
Hap 2	0.0015																			
Hap 3	**0.0007**	0.0022																		
Hap 4	0.0119	0.0104	0.0126																	
Hap 5	0.0164	0.0149	0.0171	0.0045																
Hap 6	0.0156	0.0141	0.0164	0.0037	**0.0007**															
Hap 7	0.0156	0.0141	0.0164	0.0037	0.0037	0.0030														
Hap 8	0.0149	0.0134	0.0156	0.0030	0.0030	0.0022	0.0067													
Hap 9	0.0149	0.0134	0.0156	0.0030	0.0030	0.0022	0.0022	0.0045												
Hap 10	0.0164	0.0149	0.0171	0.0045	0.0045	0.0037	0.0022	0.0045	0.0015											
Hap 11	0.0164	0.0149	0.0171	0.0045	0.0030	0.0022	0.0037	0.0074	0.0030	0.0045										
Hap 12	0.0156	0.0141	0.0164	0.0052	0.0082	0.0074	0.0089	0.0022	0.0067	0.0067	0.0097									
Hap 13	0.0134	0.0119	0.0141	0.0030	0.0030	0.0022	0.0022	0.0059	0.0015	0.0030	0.0030	0.0082								
Hap 14	0.0112	0.0097	0.0119	**0.0007**	0.0052	0.0045	0.0045	0.0037	0.0037	0.0052	0.0052	0.0059	0.0037							
Hap 15	0.0141	0.0126	0.0149	0.0022	0.0067	0.0059	0.0059	0.0052	0.0052	0.0067	0.0067	0.0074	0.0052	0.0030						
Hap 16	0.0141	0.0126	0.0149	0.0022	0.0067	0.0059	0.0059	0.0052	0.0052	0.0067	0.0067	0.0074	0.0052	0.0030	0.0015					
Hap 17	0.0134	0.0119	0.0141	0.0015	0.0059	0.0052	0.0052	0.0045	0.0045	0.0059	0.0059	0.0067	0.0045	0.0022	**0.0007**	**0.0007**				
Hap 18	0.0141	0.0126	0.0149	0.0022	0.0067	0.0059	0.0059	0.0052	0.0052	0.0067	0.0067	0.0074	0.0052	0.0030	0.0015	0.0015	**0.0007**			
Hap 19	0.0156	0.0141	0.0164	0.0037	0.0022	0.0015	0.0030	0.0067	0.0022	0.0037	**0.0007**	0.0089	0.0022	0.0045	0.0059	0.0059	0.0052	0.0059		
Hap 20	0.0141	0.0126	0.0149	0.0022	0.0067	0.0059	0.0059	0.0052	0.0052	0.0067	0.0067	0.0074	0.0052	0.0030	0.0015	0.0015	**0.0007**	0.0015	0.0059	
Hap 21	0.0134	0.0119	0.0141	0.0030	0.0074	0.0067	0.0067	0.0059	0.0059	0.0074	0.0074	0.0067	0.0059	0.0037	0.0022	0.0022	0.0015	0.0022	0.0067	0.0022
Hap 22	0.0059	0.0045	0.0067	0.0149	0.0193	0.0186	0.0186	0.0178	0.0178	0.0193	0.0193	0.0186	0.0164	0.0141	0.0171	0.0171	0.0164	0.0171	0.0186	0.0171
Hap 23	0.0126	0.0112	0.0134	**0.0007**	0.0037	0.0030	0.0030	0.0037	0.0022	0.0037	0.0037	0.0059	0.0022	0.0015	0.0030	0.0030	0.0022	0.0030	0.0030	0.0030
Hap 24	0.0141	0.0126	0.0149	0.0022	0.0037	0.0030	0.0030	0.0052	0.0022	0.0037	0.0037	0.0074	0.0022	0.0030	0.0045	0.0045	0.0037	0.0045	0.0030	0.0045
Hap 25	0.0134	0.0119	0.0141	0.0015	0.0030	0.0022	0.0022	0.0045	0.0015	0.0030	0.0030	0.0067	0.0015	0.0022	0.0037	0.0037	0.0030	0.0037	0.0022	0.0037
Hap 26	0.0134	0.0119	0.0141	0.0015	0.0045	0.0052	0.0052	0.0045	0.0045	0.0059	0.0059	0.0067	0.0045	0.0022	0.0037	0.0037	0.0030	0.0037	0.0052	0.0037
Hap 27	0.0141	0.0126	0.0149	0.0022	0.0037	0.0030	0.0030	0.0052	0.0022	0.0037	0.0037	0.0074	0.0022	0.0030	0.0045	0.0045	0.0037	0.0045	0.0030	0.0045
Hap 28	0.0074	0.0059	0.0082	0.0164	0.0208	0.0201	0.0201	0.0193	0.0193	0.0208	0.0208	0.0201	0.0178	0.0156	0.0186	0.0186	0.0178	0.0186	0.0201	0.0186
Hap 29	0.0059	0.0045	0.0067	0.0149	0.0193	0.0186	0.0186	0.0178	0.0178	0.0193	0.0193	0.0186	0.0164	0.0141	0.0171	0.0171	0.0164	0.0171	0.0186	0.0171
Hap 30	0.0059	0.0045	0.0067	0.0149	0.0193	0.0186	0.0186	0.0178	0.0178	0.0193	0.0193	0.0186	0.0164	0.0141	0.0171	0.0171	0.0164	0.0171	0.0186	0.0171
Hap 31	0.0067	0.0052	0.0074	0.0156	0.0201	0.0193	0.0193	0.0186	0.0186	0.0201	0.0201	0.0193	0.0171	0.0149	0.0178	0.0178	0.0171	0.0178	0.0193	0.0178
Hap 32	0.0149	0.0134	0.0156	0.0030	0.0030	0.0022	0.0022	0.0059	0.0015	0.0030	0.0030	0.0082	0.0015	0.0037	0.0052	0.0052	0.0045	0.0052	0.0022	0.0052
Hap 33	0.0156	0.0141	0.0164	0.0037	0.0037	0.0030	0.0030	0.0067	0.0022	0.0037	0.0037	0.0089	0.0022	0.0045	0.0059	0.0059	0.0052	0.0059	0.0030	0.0059
Hap 34	0.0156	0.0141	0.0164	0.0037	0.0022	0.0015	0.0030	0.0067	0.0022	0.0037	0.0037	0.0074	0.0022	0.0045	0.0059	0.0059	0.0052	0.0059	0.0030	0.0059
Hap 35	0.0141	0.0126	0.0149	0.0022	0.0022	0.0015	0.0015	0.0052	**0.0007**	0.0022	0.0022	0.0074	**0.0007**	0.0030	0.0045	0.0045	0.0037	0.0045	0.0015	0.0045
Hap 36	0.0156	0.0141	0.0164	0.0037	0.0037	0.0030	0.0030	0.0052	0.0022	0.0037	0.0037	0.0074	0.0022	0.0045	0.0059	0.0059	0.0052	0.0059	0.0030	0.0059
Hap 37	0.0037	0.0022	0.0045	0.0112	0.0156	0.0149	0.0149	0.0141	0.0141	0.0156	0.0156	0.0149	0.0126	0.0104	0.0134	0.0134	0.0126	0.0134	0.0149	0.0134
Hap 38	0.0030	0.0015	0.0037	0.0104	0.0134	0.0141	0.0141	0.0134	0.0134	0.0149	0.0149	0.0141	0.0119	0.0097	0.0126	0.0126	0.0119	0.0126	0.0141	0.0126
Hap 39	0.0022	**0.0007**	0.0030	0.0097	0.0141	0.0134	0.0134	0.0126	0.0126	0.0141	0.0141	0.0134	0.0112	0.0089	0.0119	0.0119	0.0112	0.0119	0.0134	0.0119
Hap 40	0.0037	0.0022	0.0045	0.0112	0.0156	0.0149	0.0149	0.0141	0.0141	0.0156	0.0156	0.0149	0.0126	0.0104	0.0134	0.0134	0.0126	0.0134	0.0149	0.0134
Hap 41	0.0089	0.0074	0.0097	0.0134	0.0164	0.0156	0.0171	0.0164	0.0164	0.0178	0.0156	0.0171	0.0164	0.0126	0.0156	0.0156	0.0149	0.0156	0.0156	0.0156
Hap 42	0.0097	0.0082	0.0104	0.0141	0.0171	0.0164	0.0178	0.0171	0.0171	0.0186	0.0164	0.0178	0.0171	0.0134	0.0164	0.0164	0.0156	0.0164	0.0164	0.0164
Hap 43	0.0134	0.0119	0.0141	0.0030	0.0074	0.0067	0.0067	0.0045	0.0059	0.0074	0.0074	0.0067	0.0059	0.0037	0.0052	0.0052	0.0045	0.0052	0.0067	0.0052
Hap 44	0.0171	0.0156	0.0178	0.0052	0.0037	0.0030	0.0045	0.0082	0.0037	0.0052	**0.0007**	0.0104	0.0037	0.0059	0.0074	0.0074	0.0067	0.0074	0.0015	0.0074
Hap 45	0.0126	0.0112	0.0134	**0.0007**	0.0052	0.0045	0.0045	0.0037	0.0037	0.0052	0.0052	0.0059	0.0037	0.0015	0.0030	0.0030	0.0022	0.0030	0.0045	0.0030
Hap 46	0.0141	0.0126	0.0149	0.0037	0.0067	0.0059	0.0059	0.0052	0.0052	0.0067	0.0067	0.0074	0.0052	0.0045	0.0059	0.0059	0.0052	0.0059	0.0059	0.0059
Hap 47	0.0149	0.0134	0.0156	0.0045	0.0089	0.0082	0.0082	0.0059	0.0074	0.0089	0.0089	0.0082	0.0074	0.0052	0.0067	0.0067	0.0059	0.0067	0.0082	0.0067
Hap 48	0.0141	0.0126	0.0149	0.0037	0.0082	0.0074	0.0074	0.0052	0.0067	0.0082	0.0082	0.0074	0.0067	0.0045	0.0059	0.0059	0.0052	0.0059	0.0074	0.0059
Hap 49	0.0067	0.0052	0.0074	0.0156	0.0201	0.0193	0.0193	0.0186	0.0186	0.0201	0.0201	0.0193	0.0171	0.0149	0.0178	0.0178	0.0171	0.0178	0.0193	0.0178
Hap 50	0.0149	0.0134	0.0141	0.0045	0.0089	0.0082	0.0082	0.0015	0.0059	0.0059	0.0089	0.0037	0.0074	0.0052	0.0067	0.0067	0.0059	0.0067	0.0082	0.0067
Hap 51	0.0156	0.0141	0.0164	0.0037	0.0067	0.0074	0.0074	**0.0007**	0.0052	0.0052	0.0082	0.0030	0.0067	0.0045	0.0059	0.0059	0.0052	0.0059	0.0074	0.0059
Hap 52	0.0164	0.0149	0.0171	0.0045	0.0089	0.0082	0.0082	0.0015	0.0059	0.0059	0.0089	0.0037	0.0074	0.0052	0.0052	0.0067	0.0059	0.0067	0.0082	0.0067
Hap 53	0.0156	0.0141	0.0164	0.0037	0.0082	0.0074	0.0074	**0.0007**	0.0052	0.0052	0.0082	0.0030	0.0067	0.0045	0.0059	0.0059	0.0052	0.0059	0.0074	0.0059
Hap 54	0.0164	0.0149	0.0171	0.0045	0.0089	0.0082	0.0082	0.0015	0.0059	0.0059	0.0089	0.0022	0.0074	0.0052	0.0067	0.0067	0.0059	0.0067	0.0082	0.0067
Hap 55	0.0164	0.0149	0.0171	0.0045	0.0074	0.0082	0.0082	0.0015	0.0059	0.0059	0.0089	0.0037	0.0074	0.0052	0.0067	0.0067	0.0059	0.0067	0.0082	0.0067
Hap 56	0.0156	0.0141	0.0164	0.0037	0.0082	0.0074	0.0074	**0.0007**	0.0052	0.0052	0.0082	0.0030	0.0067	0.0045	0.0059	0.0059	0.0052	0.0059	0.0074	0.0059
Hap 57	0.0097	0.0082	0.0104	0.0141	0.0171	0.0164	0.0178	0.0171	0.0171	0.0186	0.0164	0.0178	0.0171	0.0134	0.0164	0.0164	0.0156	0.0164	0.0164	0.0164
Hap 58	0.0104	0.0089	0.0112	0.0149	0.0178	0.0171	0.0171	0.0178	0.0178	0.0178	0.0171	0.0186	0.0178	0.0141	0.0171	0.0171	0.0164	0.0171	0.0171	0.0171
Hap 59	0.0089	0.0074	0.0097	0.0134	0.0164	0.0156	0.0171	0.0164	0.0164	0.0178	0.0156	0.0171	0.0164	0.0126	0.0156	0.0156	0.0149	0.0156	0.0156	0.0156
Hap 60	0.0089	0.0074	0.0097	0.0134	0.0164	0.0156	0.0171	0.0164	0.0164	0.0178	0.0156	0.0171	0.0164	0.0126	0.0156	0.0156	0.0149	0.0156	0.0156	0.0156

Distância p (não corrigida) entre os haplótipos mitocondriais de Gymnotus pantherinus

	Hap 21	Hap 22	Hap 23	Hap 24	Hap 25	Hap 26	Hap 27	Hap 28	Hap 29	Hap 30	Hap 31	Hap 32	Hap 33	Hap 34	Hap 35	Hap 36	Hap 37	Hap 38	Hap 39	Hap 40
Hap 1																				
Hap 2																				
Hap 3																				
Hap 4																				
Hap 5																				
Hap 6																				
Hap 7																				
Hap 8																				
Hap 9																				
Hap 10																				
Hap 11																				
Hap 12																				
Hap 13																				
Hap 14																				
Hap 15																				
Hap 16																				
Hap 17																				
Hap 18																				
Hap 19																				
Hap 20																				
Hap 21																				
Hap 22	0.0164																			
Hap 23	0.0037	0.0156																		
Hap 24	0.0052	0.0171	0.0015																	
Hap 25	0.0045	0.0164	**0.0007**	**0.0007**																
Hap 26	0.0045	0.0164	0.0022	0.0037	0.0030															
Hap 27	0.0052	0.0171	0.0015	0.0015	**0.0007**	0.0037														
Hap 28	0.0178	0.0030	0.0171	0.0186	0.0178	0.0178	0.0186													
Hap 29	0.0164	0.0015	0.0156	0.0171	0.0164	0.0164	0.0171	0.0015												
Hap 30	0.0164	0.0074	0.0156	0.0171	0.0164	0.0164	0.0171	0.0089	0.0074											
Hap 31	0.0171	**0.0007**	0.0164	0.0178	0.0171	0.0171	0.0178	0.0037	0.0022	0.0082										
Hap 32	0.0059	0.0178	0.0022	0.0022	0.0015	0.0045	0.0022	0.0193	0.0178	0.0178	0.0186									
Hap 33	0.0067	0.0186	0.0030	0.0030	0.0022	0.0052	0.0030	0.0201	0.0186	0.0178	0.0193	0.0022								
Hap 34	0.0067	0.0186	0.0030	0.0030	0.0022	0.0052	0.0015	0.0201	0.0186	0.0186	0.0193	0.0022	0.0030							
Hap 35	0.0052	0.0171	0.0015	0.0015	**0.0007**	0.0037	0.0015	0.0186	0.0171	0.0171	0.0178	**0.0007**	0.0015	0.0015						
Hap 36	0.0067	0.0186	0.0030	0.0030	0.0022	0.0052	0.0030	0.0201	0.0186	0.0186	0.0193	0.0022	0.0030	0.0030	0.0015					
Hap 37	0.0126	0.0067	0.0119	0.0134	0.0126	0.0126	0.0134	0.0082	0.0067	0.0067	0.0074	0.0141	0.0149	0.0149	0.0134	0.0149				
Hap 38	0.0119	0.0059	0.0112	0.0126	0.0119	0.0104	0.0126	0.0074	0.0059	0.0059	0.0067	0.0134	0.0141	0.0141	0.0126	0.0141	0.0022			
Hap 39	0.0112	0.0052	0.0104	0.0119	0.0112	0.0112	0.0119	0.0067	0.0052	0.0052	0.0059	0.0126	0.0134	0.0134	0.0119	0.0134	0.0015	**0.0007**		
Hap 40	0.0126	0.0067	0.0119	0.0134	0.0126	0.0126	0.0134	0.0082	0.0067	0.0067	0.0074	0.0141	0.0149	0.0149	0.0134	0.0149	0.0015	0.0022	0.0015	
Hap 41	0.0149	0.0104	0.0141	0.0156	0.0149	0.0149	0.0156	0.0119	0.0104	0.0119	0.0104	0.0164	0.0171	0.0171	0.0156	0.0171	0.0082	0.0074	0.0067	0.0082
Hap 42	0.0156	0.0112	0.0149	0.0164	0.0156	0.0156	0.0164	0.0126	0.0112	0.0126	0.0112	0.0171	0.0178	0.0178	0.0164	0.0178	0.0089	0.0082	0.0074	0.0089
Hap 43	0.0059	0.0149	0.0037	0.0052	0.0045	0.0045	0.0052	0.0178	0.0164	0.0164	0.0156	0.0059	0.0067	0.0067	0.0052	0.0052	0.0126	0.0119	0.0112	0.0126
Hap 44	0.0082	0.0201	0.0045	0.0045	0.0037	0.0067	0.0045	**0.0216**	0.0201	0.0201	0.0208	0.0037	0.0045	0.0045	0.0030	0.0045	0.0164	0.0156	0.0149	0.0164
Hap 45	0.0037	0.0156	0.0015	0.0030	0.0022	0.0022	0.0030	0.0171	0.0156	0.0156	0.0164	0.0037	0.0045	0.0045	0.0030	0.0045	0.0126	0.0112	0.0104	0.0119
Hap 46	0.0067	0.0156	0.0045	0.0059	0.0052	0.0052	0.0059	0.0186	0.0171	0.0171	0.0164	0.0052	0.0059	0.0059	0.0045	0.0045	0.0134	0.0126	0.0119	0.0134
Hap 47	0.0074	0.0164	0.0052	0.0067	0.0059	0.0059	0.0067	0.0193	0.0178	0.0178	0.0156	0.0074	0.0082	0.0082	0.0067	0.0067	0.0141	0.0134	0.0126	0.0141
Hap 48	0.0067	0.0156	0.0045	0.0059	0.0052	0.0052	0.0059	0.0186	0.0171	0.0171	0.0164	0.0067	0.0074	0.0074	0.0059	0.0059	0.0134	0.0126	0.0119	0.0134
Hap 49	0.0171	0.0022	0.0164	0.0178	0.0171	0.0171	0.0178	0.0037	0.0022	0.0082	0.0030	0.0186	0.0193	0.0193	0.0178	0.0193	0.0074	0.0067	0.0059	0.0074
Hap 50	0.0074	0.0178	0.0052	0.0067	0.0059	0.0059	0.0067	0.0193	0.0178	0.0178	0.0186	0.0074	0.0082	0.0082	0.0067	0.0067	0.0141	0.0134	0.0126	0.0141
Hap 51	0.0067	0.0186	0.0045	0.0059	0.0052	0.0037	0.0059	0.0201	0.0186	0.0186	0.0193	0.0067	0.0074	0.0074	0.0059	0.0059	0.0149	0.0126	0.0134	0.0149
Hap 52	0.0074	0.0193	0.0052	0.0067	0.0059	0.0059	0.0067	0.0208	0.0193	0.0193	0.0201	0.0074	0.0082	0.0082	0.0067	0.0052	0.0156	0.0149	0.0141	0.0156
Hap 53	0.0067	0.0186	0.0045	0.0059	0.0052	0.0052	0.0059	0.0201	0.0186	0.0186	0.0193	0.0067	0.0074	0.0074	0.0059	0.0059	0.0149	0.0141	0.0134	0.0149
Hap 54	0.0074	0.0193	0.0052	0.0067	0.0059	0.0059	0.0067	0.0208	0.0193	0.0193	0.0201	0.0074	0.0082	0.0082	0.0067	0.0067	0.0156	0.0149	0.0141	0.0156
Hap 55	0.0074	0.0193	0.0052	0.0067	0.0059	0.0045	0.0067	0.0208	0.0193	0.0193	0.0201	0.0074	0.0082	0.0082	0.0067	0.0067	0.0156	0.0134	0.0141	0.0156
Hap 56	0.0067	0.0186	0.0045	0.0059	0.0052	0.0052	0.0059	0.0201	0.0186	0.0186	0.0193	0.0067	0.0074	0.0074	0.0059	0.0059	0.0149	0.0141	0.0134	0.0149
Hap 57	0.0156	0.0112	0.0149	0.0164	0.0156	0.0156	0.0164	0.0126	0.0112	0.0126	0.0112	0.0171	0.0178	0.0178	0.0164	0.0178	0.0089	0.0082	0.0074	0.0089
Hap 58	0.0164	0.0119	0.0156	0.0171	0.0164	0.0164	0.0171	0.0134	0.0119	0.0134	0.0119	0.0178	0.0186	0.0186	0.0171	0.0186	0.0097	0.0089	0.0082	0.0097
Hap 59	0.0149	0.0104	0.0141	0.0156	0.0149	0.0149	0.0156	0.0119	0.0104	0.0119	0.0112	0.0164	0.0171	0.0171	0.0156	0.0171	0.0082	0.0074	0.0067	0.0082
Hap 60	0.0149	0.0104	0.0141	0.0156	0.0149	0.0149	0.0156	0.0119	0.0104	0.0119	0.0104	0.0164	0.0171	0.0171	0.0156	0.0171	0.0082	0.0074	0.0067	0.0082

ANEXO 5

Distância p (não corrigida) entre os haplótipos mitocondriais de Gymnotus pantherinus

	Hap 41	Hap 42	Hap 43	Hap 44	Hap 45	Hap 46	Hap 47	Hap 48	Hap 49	Hap 50	Hap 51	Hap 52	Hap 53	Hap 54	Hap 55	Hap 56	Hap 57	Hap 58	Hap 59	Hap 60
Hap 1																				
Hap 2																				
Hap 3																				
Hap 4																				
Hap 5																				
Hap 6																				
Hap 7																				
Hap 8																				
Hap 9																				
Hap 10																				
Hap 11																				
Hap 12																				
Hap 13																				
Hap 14																				
Hap 15																				
Hap 16																				
Hap 17																				
Hap 18																				
Hap 19																				
Hap 20																				
Hap 21																				
Hap 22																				
Hap 23																				
Hap 24																				
Hap 25																				
Hap 26																				
Hap 27																				
Hap 28																				
Hap 29																				
Hap 30																				
Hap 31																				
Hap 32																				
Hap 33																				
Hap 34																				
Hap 35																				
Hap 36																				
Hap 37																				
Hap 38																				
Hap 39																				
Hap 40																				
Hap 41																				
Hap 42	**0.0007**																			
Hap 43	0.0149	0.0156																		
Hap 44	0.0164	0.0171	0.0082																	
Hap 45	0.0141	0.0149	0.0037	0.0059																
Hap 46	0.0156	0.0164	**0.0007**	0.0074	0.0045															
Hap 47	0.0156	0.0164	0.0015	0.0097	0.0052	0.0022														
Hap 48	0.0156	0.0164	**0.0007**	0.0089	0.0045	0.0015	**0.0007**													
Hap 49	0.0112	0.0119	0.0171	0.0208	0.0164	0.0178	0.0186	0.0178												
Hap 50	0.0164	0.0171	0.0059	0.0097	0.0052	0.0067	0.0074	0.0067	0.0186											
Hap 51	0.0171	0.0178	0.0052	0.0089	0.0045	0.0059	0.0067	0.0059	0.0193	0.0022										
Hap 52	0.0178	0.0186	0.0059	0.0097	0.0052	0.0067	0.0074	0.0067	0.0201	0.0030	0.0022									
Hap 53	0.0171	0.0178	0.0052	0.0089	0.0045	0.0059	0.0067	0.0059	0.0193	0.0022	0.0015	0.0022								
Hap 54	0.0178	0.0186	0.0059	0.0097	0.0052	0.0067	0.0074	0.0067	0.0201	0.0030	**0.0007**	0.0030	0.0022							
Hap 55	0.0178	0.0186	0.0059	0.0097	0.0052	0.0067	0.0074	0.0067	0.0201	0.0030	0.0015	**0.0007**	0.0015	0.0030						
Hap 56	0.0171	0.0178	0.0052	0.0089	0.0045	0.0059	0.0067	0.0059	0.0193	0.0022	0.0015	0.0030	0.0022	0.0022	0.0022					
Hap 57	0.0022	0.0015	0.0156	0.0171	0.0149	0.0164	0.0164	0.0164	0.0119	0.0171	0.0178	0.0186	0.0178	0.0186	0.0186	0.0178				
Hap 58	0.0030	0.0022	0.0164	0.0178	0.0156	0.0171	0.0171	0.0171	0.0126	0.0178	0.0186	0.0193	0.0186	0.0193	0.0193	0.0186	0.0022			
Hap 59	0.0030	0.0022	0.0149	0.0164	0.0141	0.0156	0.0164	0.0156	0.0112	0.0164	0.0171	0.0178	0.0171	0.0178	0.0178	0.0171	0.0022	0.0030		
Hap 60	0.0015	**0.0007**	0.0149	0.0164	0.0141	0.0156	0.0156	0.0156	0.0112	0.0164	0.0171	0.0178	0.0171	0.0178	0.0178	0.0171	**0.0007**	0.0015	0.0015	