

TIAGO LEÃO PEREIRA

**Divergência genômica e filogeografia de traíras
Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) (Teleostei:
Erythrinidae) na costa leste do Brasil**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P436d
2005
Pereira, Tiago Leão, 1979-
Divergência genômica e filogeografia de traíras
Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) (Teleostei :
Erythrinidae) na costa leste do Brasil. / Tiago Leão Pereira.
– Viçosa : UFV, 2005.
viii, 67f. : il. ; 29cm.

Orientador: Jorge Abdala Dergan dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referência bibliográfica: f. 48-56.

1. Traíra (Peixe) - Genética molecular. 2. Peixe de
água doce - Distribuição geográfica - Brasil, Leste.
3. Biogeografia. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 574.92981

TIAGO LEÃO PEREIRA

**Divergência genômica e filogeografia de traíras *Hoplias malabaricus*
(Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) na costa leste do Brasil**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADO: 12 de maio de 2005

Prof. Carlos Ernesto G. R. Schaefer
(conselheiro)

Prof. Paulo De Marco Júnior
(conselheiro)

Prof. Renato Neves Feio

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos
(orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha noiva, Gabriela, pelo amor, amizade, paciência e cumplicidade, não apenas durante o período deste projeto, mas durante todos os bons e maus momentos dos últimos cinco anos.

Aos meus pais, Célio e Esther, e meus irmãos, Érico e Nádia, pela verdadeira educação, pelo irrestrito apoio ao meu investimento em conhecimento e por serem quem são. Aliás, por eu ser quem sou.

Ao meu orientador, Jorge Dergam, pelas boas risadas, broncas, aulas de evolução, amizade, desorientação e, ah sim, pela orientação também!

Ao amigo e professor Carlos Schaefer pelas dicas essenciais para o nascimento deste trabalho.

À amiga Gisele Souza que se “desentendeu” várias vezes com as ponteiras, géis e centrífugas, mas batalhou até o final para ver esta tese pronta.

Aos amigos, professores, membros desta banca e fiéis torcedores do Atlético Mineiro, Renato Feio e Paulo De Marco.

Ao professor Luiz Orlando por mostrar-se disponível a ler e discutir os ‘finalmentes’ deste trabalho.

Aos amigos do Grupo de Ecologia de Organismos Invasores, Anderson Latini, Dilermando Lima Júnior, Henrique Giacomini, Helder Mateus (Zé Baía), Ricardo Latini (Mancha), Lorena O’Porto, Daniela Resende, Flávia Lima e Diliane Barros. Meus eternos colegas de pescaria e com quem descobri que peixes podem ser um bom negócio!

Ao amigo Samuel Paiva pelo apoio logístico e ensinamentos práticos de biologia molecular.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática Molecular, Eduardo Eler e Fabrício (Boi), e a todos aqueles que aqui estão ou por aqui passaram durante minha “reclusão” no referido laboratório.

Ao professor Marcelo Vilela por ceder seu laboratório para a execução do presente trabalho e pelo bom papo.

Aos meus amigos viçosenses e divinopolitanos que, tenho certeza, torceram por um final feliz deste trabalho. Mesmo que fosse para tomar uma cerveja depois!

Aos vários coletores de tecidos de traíras, que forneceram a matéria prima para este trabalho e, certamente, o fizeram após um longo discurso sobre biogeografia, evolução, conservação, política, filosofia e sei lá o que, do meu orientador.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por acreditar em nosso trabalho provendo recursos financeiros essenciais para o desenvolvimento deste.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos a mim concedida.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a elaboração desta tese.

A todos aqueles que contribuem de alguma forma para a melhoria deste país.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
APRESENTAÇÃO	01
CAPÍTULO 1 - Divergência genética em traíras <i>Hoplias malabaricus</i> (Teleostei, Erythrinidae): a influência do Banco Abrolhos na distribuição da ictiofauna nas bacias do leste do Brasil .	03
INTRODUÇÃO	03
MATERIAIS E MÉTODOS	09
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	16
CONCLUSÃO	24
CAPÍTULO 2 - Filogeografia de <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) na costa leste do Brasil	25
INTRODUÇÃO	25
MATERIAIS E MÉTODOS	30
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	47
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	48
ANEXO 01	57
ANEXO 02	61
ANEXO 03	65

RESUMO

PEREIRA, Tiago Leão, M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2005. **Divergência genômica e filogeografia de traíras *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) na costa leste do Brasil.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Conselheiros: Carlos Ernesto G.R. Schaefer e Paulo De Marco Júnior.

A traíra *Hoplias malabaricus* é um caraciforme de ampla distribuição, ocorrendo em todas as grandes bacias hidrográficas brasileiras, com pequena diferenciação morfológica, comportamento sedentário e grande variabilidade cariotípica, apresentando populações com pelo menos dois diferentes cariótipos nas drenagens da costa leste do Brasil. Dados seus hábitos sedentários e ampla distribuição, esta espécie representa um ótimo modelo para compreensão da relação histórica entre as bacias hidrográficas na região neotropical, particularmente da idade e do tipo de fatores que determinaram os padrões observados. A universalidade das hipóteses geradas pode ser testada com os padrões de distribuição de outras espécies não aparentadas. Com o objetivo de determinar a divergência genômica entre populações de traíras *Hoplias malabaricus* na costa leste brasileira, estimativas temporais de vicariância, bem como de formular uma hipótese biogeográfica preliminar de relação entre estas populações, foram realizadas estimativas de divergência molecular baseadas em haplótipos de mtDNA e a partir de três primers RAPD-PCR. As divergências moleculares mostraram-se consistentes com os dados citogenéticos conhecidos para *H. malabaricus*, sendo reconhecidos dois grupos denominados São Francisco (SF) e Leste (LE), a partir da variabilidade em alelos RAPD. A acidentada topografia e a inferência de um paleoclima árido no Banco Abrolhos sugerem que esta extensão da plataforma continental atua como barreira às trocas gênicas entre populações de traíras em SF e LE. Este padrão é ainda corroborado pela distribuição das espécies de peixes das bacias costeiras que, salvo raras exceções, ocorrem em apenas uma das regiões separadas por Abrolhos. As seqüências de mtDNA subdividem o grupo LE em três clados, enquanto as bacias do grupo SF apresentaram suas populações em um único clado, com

alto suporte estatístico. Uma bacia contígua às do Leste brasileiro, a bacia do rio Uruguai, apresentou três clados, sendo a única bacia estudada com simpatria de haplótipos. Estimativas baseadas em taxas de mutação sugerem uma diferenciação miocênica entre os clados costeiros, enquanto eventos pleistocênicos explicariam as diferenças observadas dentro de cada clado. A concordância entre dados moleculares, cariotípicos e de distribuição de espécies sugere que fatores históricos compartilhados por diferentes linhagens tiveram um importante papel na distribuição contemporânea da diversidade ictiofaunística da costa leste brasileira.

ABSTRACT

PEREIRA, Tiago Leão, M.S., Universidade Federal de Viçosa, may, 2005. **Genomic divergence and phylogeography in trahira *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) on Brazilian eastern costal basins.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Conselheiros: Carlos Ernesto G.R. Schaefer and Paulo De Marco Júnior.

The common trahira, *H. malabaricus* is a widespread characin in the Neotropical region. It is a nonmigratory species characterized by complex patterns of morphological variation and high levels of karyotypic differentiation, with seven karyotypes (cytotypes) described in South America. Its sedentary habits makes this species a particularly informative model for phylogeographic studies. This study characterized the genomic divergence of this species along the eastern Brazilian coast and proposed a temporal frame for vicariant events in this region. Data were obtained from RAPD-PCR markers and mitochondrial DNA divergence. The molecular patterns were congruent with known diploid numbers. RAPD-PCR alleles showed two well-defined São Francisco and Eastern groups. Further resolution was obtained with mitochondrial DNA. According to maximum parsimony and maximum likelihood cladograms, the Eastern group is subdivided in three clades, whereas the São Francisco group remained undivided. A major vicariant event between the São Francisco and Eastern groups was interpreted as a result of arid and hypersaline environmental conditions favored by a projection of the Abrolhos platform on the continent that was particularly active during glacial periods. All eastern basins were characterized by allopatric cytotypes, in contrast with neighboring basins such as the Paraná and the Uruguay drainages, where $2n=40$ and $2n=42$ cytotypes are sympatric. A molecular clock-based hypothesis suggests a Miocene age for lineage splitting between the São Francisco and Eastern coastal clades whereas Pleistocene events would explain more shallow divergences observed within each clade.

APRESENTAÇÃO

O termo biodiversidade abrange a variabilidade biológica em número de espécies, interações e divergências genéticas. A necessidade de determinação de quais seriam os elementos evolutivos e ecológicos relevantes para a determinação das prioridades para conservação, juntamente com o desenvolvimento da biologia molecular e de elementos conceituais da sistemática, favoreceram o florescimento de disciplinas como a genética da conservação e a biogeografia. Neste contexto a filogeografia, o estudo dos componentes históricos e filogenéticos responsáveis pela distribuição espacial das linhagens de genes, surge como uma sub-disciplina da biogeografia, servindo para contextualizar temporalmente a ecogeografia tradicional que enfatiza o papel das pressões ecológicas contemporâneas na formatação espacial dos traços dos diferentes organismos.

Uma rica literatura sobre seleção ilustra como gradientes ambientais podem gerar padrões clinais na adaptação de organismos. Algumas destas respostas são idiosincráticas, enquanto outras refletem tendências suficientemente pronunciadas ou recorrentes em espécies não aparentadas, constituindo padrões de variação reconhecidos como ‘regras ecogeográficas’. Entretanto, a seleção natural não é o único fator capaz de gerar padrões geográficos nos atributos genéticos. Populações que historicamente experimentam pequenos ou nenhum fluxo gênico por grandes períodos temporais, as divergências genéticas são inexoráveis. A filogeografia, então, detecta pegadas evolutivas (*footprints*) na distribuição geográfica contemporânea baseada em traços gênicos (Avise, 2000).

A dependência de fatores geomorfológicos é particularmente clara em espécies de dispersão restrita, como peixes estenoalinos, e é especialmente informativa em táxons de ampla distribuição. Na América do Sul, muitos estudos biogeográficos abordam eventos responsáveis pela diversificação de peixes neotropicais. A separação do continente africano (Lundberg *et al.*, 1998) e a formação de um istmo entre as Américas tiveram, provavelmente, grandes influências no isolamento e dispersão de grandes grupos de peixes

(ver Perdices *et al.*, 2002). Entretanto, a elevação da cadeia andina é interpretada como o principal determinante do atual sistema de drenagem sul-americano, com 93% de seus sistemas fluviais drenados para o Atlântico (Lundberg *et al.* 1998). Apesar de sua importância, a visão de uma grande diversificação da ictiofauna provocada pela vicariância resultante dos Andes e, portanto, restrita aos últimos 8-10 milhões de anos, seria simplista (Lundberg *et al.* 1998). Posteriores eventos de vicariância, coalescência e extensão de sistemas de drenagem devem também ser considerados como fatores determinantes da diversidade de peixes neotropicais.

Entre as espécies passíveis de serem estudadas em escala continental num contexto filogeográfico das bacias sul-americanas, encontra-se a traíra *Hoplias malabaricus*. Esta espécie destaca-se principalmente por seu hábito sedentário, o que permite uma rápida diferenciação genética entre populações. Por estes motivos a traíra será, aqui, usada como modelo para o estudo de relação entre bacias de drenagem da costa leste do Brasil.

A formatação dos capítulos desta dissertação foi feita em concordância com as normas para publicação exigidas pela revista Neotropical Ichthyology.

Glossário

PCR – Reação da polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction*);

RAPD – Amplificação aleatorizada de DNA polimórfico (*random amplification of polymorphic DNA*);

SSCP – Polimorfismo na conformação da fita simples (*single-strand conformation polymorphism*).

CAPÍTULO 1

Divergência genômica em traíras *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae): a influência do Banco Abrolhos na distribuição da ictiofauna nas bacias do leste do Brasil

INTRODUÇÃO

A família Erythrinidae compreende um pequeno grupo de Characiformes piscívoros conhecidos popularmente por traíras, jejus e marobás. Esta família é composta pelos gêneros *Erythrinus* Scopoli, 1777, *Hoplerythrinus* Gill, 1895 e *Hoplias* Gill, 1903, ocorrendo desde a Costa Rica até o rio Colorado na Argentina (Oyakawa, 2003). Os dois primeiros gêneros compreendem peixes de médio porte (até 40 cm), enquanto *Hoplias* engloba espécies de médio e grande porte, podendo alcançar 100 cm em seu comprimento padrão, sendo também o gênero mais rico em número de espécies e de mais ampla distribuição dentro da família.

Segundo Oyakawa (1990), podem ser reconhecidos dois distintos grupos dentro do gênero *Hoplias*. O primeiro grupo, ‘malabaricus’, é monotípico e representado pela espécie nominal *H. malabaricus* (Bloch, 1794), que pode ser diferenciada das demais espécies do gênero pela presença de dentes na superfície da língua, sempre quatro poros no sistema látero-sensorial cefálico em cada lado do dentário e as margens inferiores dos dentários convergindo em direção à sínfise mandibular. Já o segundo grupo, ‘lacerdae’, apresenta um maior número de tipos, muitos endêmicos e descritos com base em caracteres de reduzido valor taxonômico para delimitação de espécies. Em uma recente revisão dos peixes de água doce neotropicais, Oyakawa (2003) reconhece nove espécies para o gênero, mas sugere a existência de formas ainda não descritas, reforçando a idéia de uma situação taxonômica confusa para o táxon.

Diferenças genéticas também têm sido documentadas para o gênero *Hoplias* desde os primeiros trabalhos de Bertollo *et al.* (1978; 1979). Apesar de sua homogeneidade morfológica, *H. malabaricus* apresenta grande diversidade cariotípica. Bertollo *et al.* (2000) reconhecem a existência de sete configurações cariotípicas (citótipos) para este complexo de espécies, com variações que envolvem número diplóide, morfologia cromossômica e a presença, em alguns casos, de sistemas de cromossomos sexuais múltiplos (Bertollo *et al.*, 1979, 1983; Ferreira *et al.*, 1989; Dergam & Bertollo, 1990; Lopes & Fenocchio, 1994; Scavone *et al.*, 1994; Bertollo *et al.*, 2000).

Os números diplóides básicos são 40 e 42 cromossomos, mas algumas populações do alto Paraná caracterizam-se por apresentar machos $2n= 39$ e fêmeas $2n= 40$ (citótipo D), enquanto outras populações da bacia amazônica caracterizam-se por apresentar machos $2n= 41$ e fêmeas $2n= 40$ (citótipo G). Variações morfológicas estão, normalmente, associadas ao maior tamanho do cromossomo 1 e na semelhança entre um par acrocêntrico no cromossomo 6 e no cromossomo sexual dos citótipos E e G, respectivamente (Figura 1) (Bertollo *et al.*, 2000).

O padrão de distribuição geográfica destes citótipos é complexo, com situações de simpatria e de alopatria (Figura 2). Nos casos de simpatria, a ausência de híbridos com números diplóides intermediários sugere que os citótipos representam boas espécies biológicas e que, portanto, *H. malabaricus* representa um complexo de espécies (Scavone *et al.*, 1994; Dergam, 1996; Lopes *et al.*, 1998). A ausência de fluxo gênico entre espécimes com 40 e 42 cromossomos também é confirmada por Dergam (1996) para os rios Paraná e Aguapey, bacia do rio Uruguai, com uso de dados RAPD-PCR. A presença do citótipo C, no rio Aguapey, foi interpretada como resultado de flutuações sazonais no rio Paraná, formando planícies de inundações entre este e o rio Aguapey, e/ou de processos de dispersão por meio de canais de irrigação que mantêm uma conexão constante entre os rios Aguapey e Paraná, desde a década de 30 (Dergam, 1996; Lopes *et al.*, 1998). Dados moleculares obtidos com DNA mitocondrial (Dergam, 1996) indicam que populações do Paraná $2n= 40$ (citótipos C e D), representam a condição mais primitiva entre os citótipos, sendo o grupo basal para o complexo *H. malabaricus*.

As drenagens costeiras do Brasil caracterizam-se por apresentar o citótipo A, com número diplóide 42 e sem sistema aparente de cromossomos sexuais. O mesmo citótipo

ocorre na bacia do rio Uruguai e rios do alto Paraná, além de amostras isoladas nas bacias dos rios Amazonas, Paraguai (Born & Bertollo, 2001) e São Francisco. A presença de um citótipo aparentemente costeiro em drenagens do alto Paraná sugere a contribuição de populações costeiras às populações desta bacia, como verificado por Dergam *et al.*, (1998), Lemos *et al.* (2002) e Vicari *et al.* (2005) entre populações dos rios Ribeira de Iguape, Iguaçu e Tibagi. Com base em dados moleculares, Dergam *et al.* (2002) sugerem que os rios Doce e Grande estiveram conectados antes do soerguimento do sistema Mantiqueira na região de Aiuruoca, permitindo assim um intercâmbio de ictiofauna entre estas duas bacias.

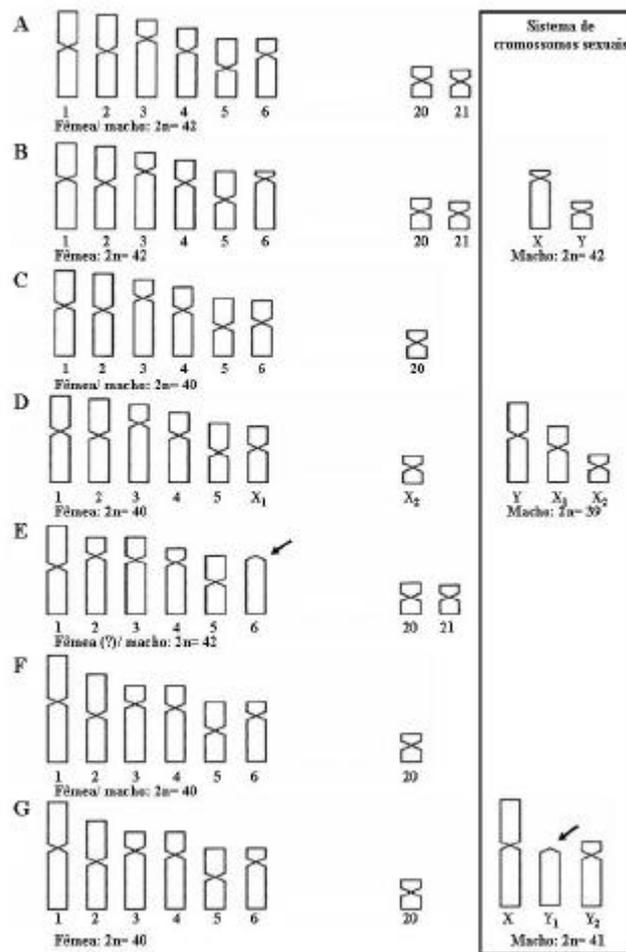


Fig. 1. Idiograma parcial dos citótipos de *H. malabaricus*. Em destaque, o sistema de cromossomos sexuais, o tamanho relativamente maior do cromossomo 1 nos citótipos F e G, e a presença de um cromossomo acrocêntrico nos citótipos E e G (seta). Modificado de Bertollo *et al.* (2000).

Recentes estudos cariotípicos no complexo *H. malabaricus* questionam a condição das bacias do Leste como uma unidade biogeográfica, com a detecção de um citótipo de distribuição setentrional (citótipo F), semelhante ao citótipo da bacia do rio São Francisco, nas bacias dos rios Jequitinhonha, Pardo (Eler *et al.*, 2004) e Contas (Moraes *et al.*, 2005).

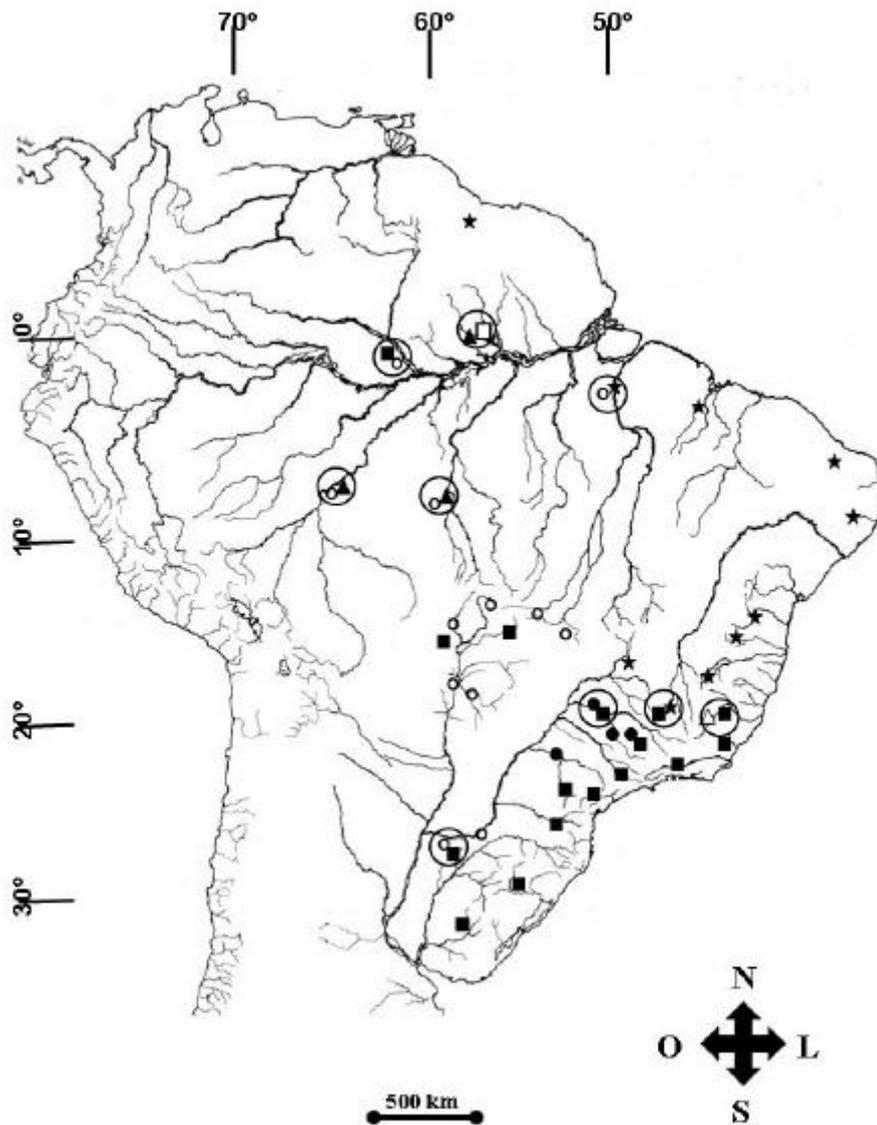


Fig. 2. Distribuição dos citótipos de *Hoplias malabaricus*: citótipo A (quadrado preto), B (triângulo branco), C (círculo branco), D (círculo preto), E (quadrado branco), F (estrela) e G (triângulo preto). Os símbolos circulados representam regiões de simpatria entre citótipos. Figura modificada de Bertollo *et al.* (2000).

A costa leste do Brasil

As bacias da costa leste do Brasil compreendem um conjunto de bacias de porte médio a pequeno, distribuídas desde Sergipe, ao sul da foz do rio São Francisco, até o Rio Grande do Sul, com drenagens para o Oceano Atlântico. O critério de subdivisão destas bacias é bastante variável e, aparentemente, subjetivo. Assim, a Agência Nacional de Águas (ANA) reconhece três regiões: a Região Leste, de Vaza Barris- BA até o rio Mucuri- BA; a Região Sudeste, de São Mateus- ES até o rio Ribeira de Iguape- SP e; a Região Sul, do norte paranaense até o arroio Chuí-RS (www.ana.gov.br). A ANEEL reconhece outras subdivisões, considerando como Bacia do Atlântico Leste as drenagens ao sul do rio São Francisco, até o limite dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Ao sul de São Paulo estaria a Bacia do Sudeste, que se estende até o Chuí-RS (www.aneel.gov.br). Todavia, estudos baseados na distribuição de espécies endêmicas de peixes sugerem a existência de sub-províncias biogeográficas na região (Menezes, 1988; Bizerril, 1994), com elementos oriundos do Paraná e São Francisco na ictiofauna das bacias do leste (Menezes, 1972; Bizerril, 1994).

As hipóteses propostas para explicar a ocorrência de espécies aparentadas entre as bacias costeiras têm sido baseadas nos efeitos das glaciações (ex. Menezes, 1988; Weitzman *et al.*, 1988; Beheregaray *et al.*, 2002). Trabalhos de cunho geográfico apresentam geralmente uma abordagem comparativa fenética, considerando apenas semelhanças e diferenças na composição das espécies nominais que ocorrem em cada bacia. Um melhor entendimento dos padrões filogenéticos dentro de um grupo com ampla distribuição na costa leste permitirá a formulação de hipóteses mais objetivas sobre as relações históricas entre as bacias.

Dada sua natureza sedentária, a traíra *Hoplias malabaricus* pode ser considerada como modelo de máxima diferenciação geográfica. Com o intuito de determinar os padrões de variação genética de populações de traíras, utilizou-se marcadores RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990) em amostras de bacias costeiras, permitindo a elaboração de agrupamentos fenéticos destas populações. Os marcadores RAPD-PCR possibilitam o estudo do DNA nuclear com custos relativamente baixos - quando comparados com outras técnicas moleculares - sendo capazes de revelar alto grau de polimorfismo, sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma da

espécie-alvo (Black 1993). Esta dinâmica é baseada no uso de apenas um primer curto (iniciador de cadeia sintético, formado por 10 bases), o qual só amplifica regiões de DNA quando as seqüências complementares ao primer encontram-se invertidas e a distâncias pouco superiores a 2000 pares de bases (2 kb). As regiões de DNA com maior probabilidade de apresentarem este tipo de seqüência são as de DNA repetitivo (Haymer, 1994), o qual pode ser caracterizado citologicamente como blocos de heterocromatina no cromossomo (Banda C), embora também se encontrem dispersas entre as seqüências de DNA cópia única.

A utilização de primers não-específicos permite, entretanto, a amplificação de segmentos de DNA com baixa estringência e repetibilidade (Pérez *et al.*, 1998). Os dados obtidos com RAPD são sensíveis a variações do DNA e permitem o estabelecimento de comparações genéticas em organismos proximalmente relacionados (Fritsch & Rieseberg, 1996), revelando-se informativos mesmo quando comparados a outras técnicas (Mamuris *et al.*, 1999; Allendorf & Seeb, 2000). Os marcadores RAPD-PCR têm sido eficientemente aplicados em estudos de variabilidade e filogenia em peixes (ver Sultmann *et al.*, 1995; Dergam, 1996; Bielawski & Pumo, 1997; Dergam *et al.*, 1998; Callejas & Ochando, 2002).

Este trabalho teve como objetivos descrever a semelhança genética entre as populações do complexo *Hoplias malabaricus* e formular uma hipótese biogeográfica preliminar sobre a distribuição de suas populações nas bacias da costa leste do Brasil. A hipótese *a priori* deste estudo é que a distribuição dos caracteres genéticos do complexo *H. malabaricus* não se dá ao acaso, ou seja, fatores históricos, geomorfológicos, determinam a distribuição de traças na costa leste do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo abrange a bacia do rio São Francisco e um conjunto de bacias denominadas conjuntamente de Bacia do Leste e Bacia do Sudeste do Brasil (Figura 3). Foram analisadas amostras de 18 sub-bacias, limitadas ao Norte pelo rio Paraguaçu-BA e ao sul pelo córrego Perequê, que deságua na baía de Paranaguá- PR. Foram utilizadas amostras do Banco de tecidos e DNA do Laboratório de Sistemática Molecular de Vertebrados do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa - MG, fiel depositário do Patrimônio Genético segundo disposição do Conselho de Proteção do Patrimônio Genético – MMA (deliberação nº 23 de 24 de abril de 2003). As amostras foram de tecidos como fígado, músculo epaxial ou filamentos branquiais retiradas do lado direito dos espécimes, fixadas em etanol absoluto e estocadas a -20° C. Parte dos exemplares amostrados foi depositada na coleção de peixes do Museu de Zoologia João Moojen de Oliveira, Departamento de Biologia Animal da instituição supracitada. Quanto às amostras de tecidos doadas por outras instituições, os exemplares-testemunha encontram-se nas coleções ictiológicas das respectivas instituições. A tabela 1 apresenta o número de indivíduos analisados para cada bacia (n total= 109), com localizações detalhadas no anexo 1.

As extrações foram processadas a partir de modificações do protocolo de Boyce *et al.* (1989), utilizando-se o detergente CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio). O DNA foi ressuspendido em Tris-HCl 1M- EDTA 0,5M pH 8,0 (filtrado e estéril) e estocado à -20°C até o momento da amplificação.

RAPD-PCR

As reações de RAPD foram processadas em volumes de 20µL, sendo 19 µL de mistura {13,8 µL de H₂O; 2 µL de tampão 10X [500 mM KCl (cloreto de potássio), 100 mM Tris-HCl]; 0,8 µL de MgCl₂ (cloreto de magnésio) 100 mM; 0,2 µL dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) 20 mM; 2 µL de oligonucleotídeos (primer) 10 mM; 0,2 µL de Taq polimerase (1 unidade)} e 1µL de DNA da amostra em concentração

aproximada de 25 ng/ μ L. Em cada reação foi adicionado um tubo de controle negativo (com todos os reagentes exceto DNA), para detecção de possíveis contaminações. As reações foram processadas em um termociclador da MJ Research (PTC100), com uma desnaturação inicial de 95° C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 35°C durante 35 segundos, 72°C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C durante 6 minutos. As amostras amplificadas foram corridas em géis de poliacrilamida 8% e visualizadas através da precipitação de nitrato de prata (Hiss *et al.*, 1994). Os géis foram secados ao ar, digitalizados e o tamanho dos alelos foi estimado a partir de uma molécula co-migrante de tamanho padronizado (1kb DNA ladder, da Gibco BRL Products).

Tabela 1. Populações de *H. malabaricus* representadas no presente estudo e respectivo número amostral.

Bacia Hidrográfica	Sigla	UF	(n)
São Francisco	SF	MG	03
Paraguaçu	PA	BA	19
Contas	CO	BA	11
Pardo	PD	MG	04
Jequitinhonha	JQ	MG	15
Buranhém	BU	BA	06
Jucuruçu	JU	MG	02
Itanhém	IN	BA/ MG	03
Mucuri	MU	MG/ ES	03
São Mateus	SM	ES	10
Doce	DO	MG	04
Itabapoana	IT	RJ	08
Paraíba do Sul	PS	MG/RJ	05
Macaé	MA	RJ	02
São João	SJ	RJ	06
Macacu	MC	RJ	02
Ribeira de Iguape	RI	SP	03
Perequê	PE	PR	03

Um teste piloto foi conduzido, com 17 primers RAPD para escolha de iniciadores que produzissem bandas polimórficas e nítidas. Um teste posterior foi realizado com diferentes amostras para a exclusão de bandas de baixa repetibilidade (menos de 90%), originadas provavelmente de artefatos da reação.

Uma matriz binária foi construída com números 1 e 2, presença e ausência da banda respectivamente. A análise do grau de semelhança genética entre as populações foi obtida com o cálculo das distâncias genéticas de Nei (1972), estimadas a partir da matriz binária e um fenograma foi obtido a partir de uma análise de agrupamento de médias pareadas não ponderadas (UPGMA), com o programa TFGA, Tools For Population Genetics Analysis (Miller, 1997). Valores de bootstrap (Efron, 1985) foram obtidos para avaliar a magnitude dos efeitos de erros amostrais sobre o fenograma a partir da re-amostragem (1000 repetições) dos próprios dados com reposição. O Teste Exato de Fisher foi utilizado para se avaliar a estrutura genética das populações a partir da hipótese nula da panmixia entre pares de todas as bacias amostradas. As amostras procedentes de uma mesma bacia foram consideradas como uma população.

Finalmente, os agrupamentos obtidos com os dados moleculares foram comparados aos padrões de distribuição de outras espécies de peixes de água doce que ocorrem nas bacias da costa leste, conforme constam no Check List of Neotropical Freshwater Fishes (Reis *et al.*, 2003), complementado por bibliografias específicas para determinados grupos. A busca foi direcionada para concordâncias e discordâncias na distribuição de espécies com relação aos dados moleculares (comparação a posteriori). No caso de algumas espécies, dados gerais como “bacias costeiras do estado da Bahia” foram mais bem definidos com informações disponíveis no banco eletrônico Inter Institucional Database of Fish Biodiversity in the Neotropics (projeto NEODAT II) (www.neodat.org).

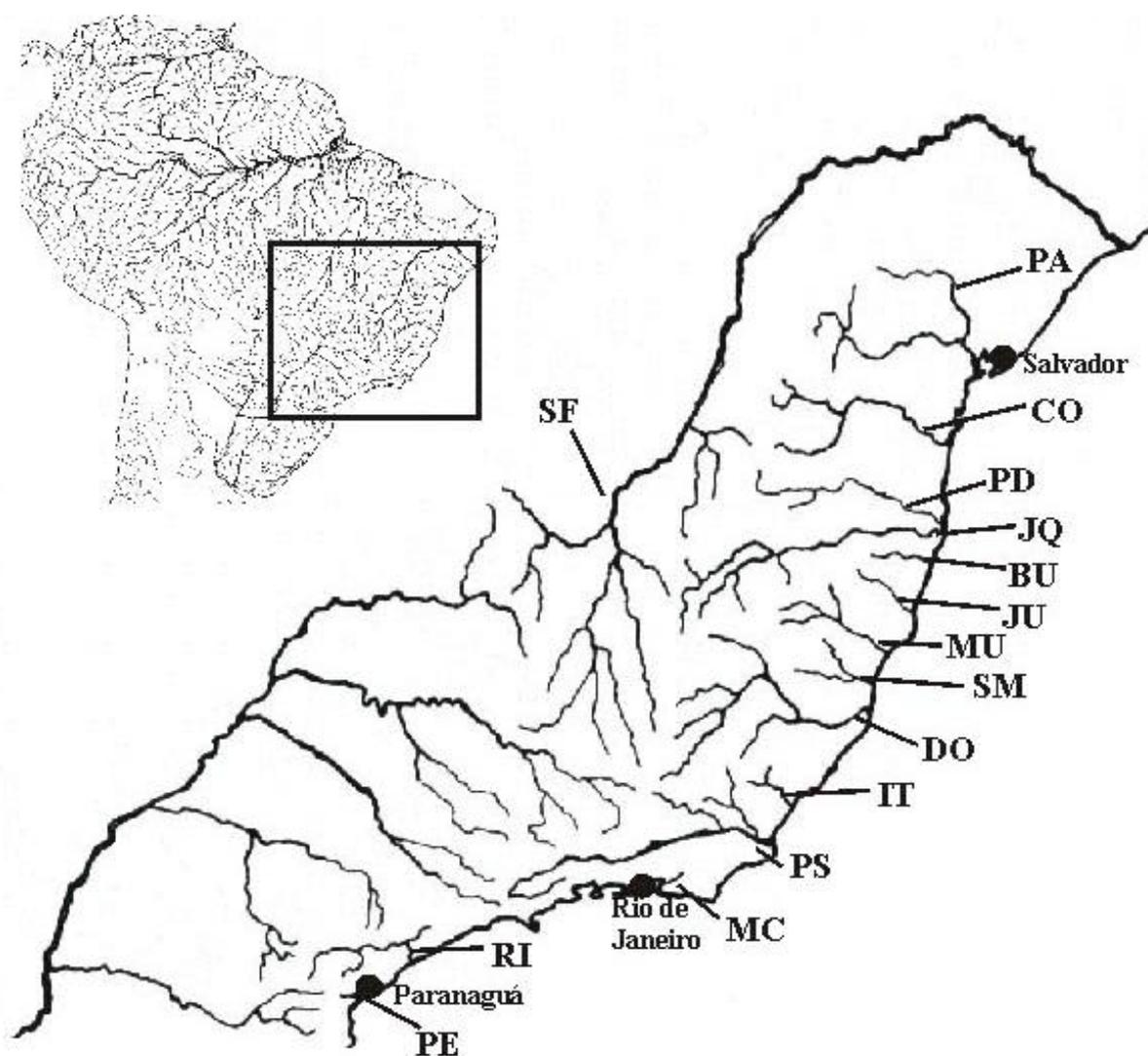


Fig. 3. Área de abrangência do estudo. As bacias dos rios Itanhém, Macaé e São João não estão representadas no mapa. As bacias hidrográficas estão identificadas segundo a Tabela 1.

RESULTADOS

Foram escolhidos três oligonucleotídeos iniciadores da reação de PCR: A-07, C-12, e C-16 (Operon Technologies), sendo utilizadas 49 bandas para a construção da matriz binária. As amostras amplificaram entre 17 e 29 bandas, variando de 396 a 2036 pb, não ocorrendo bandas monomórficas para os espécimes analisados (Figura 4).

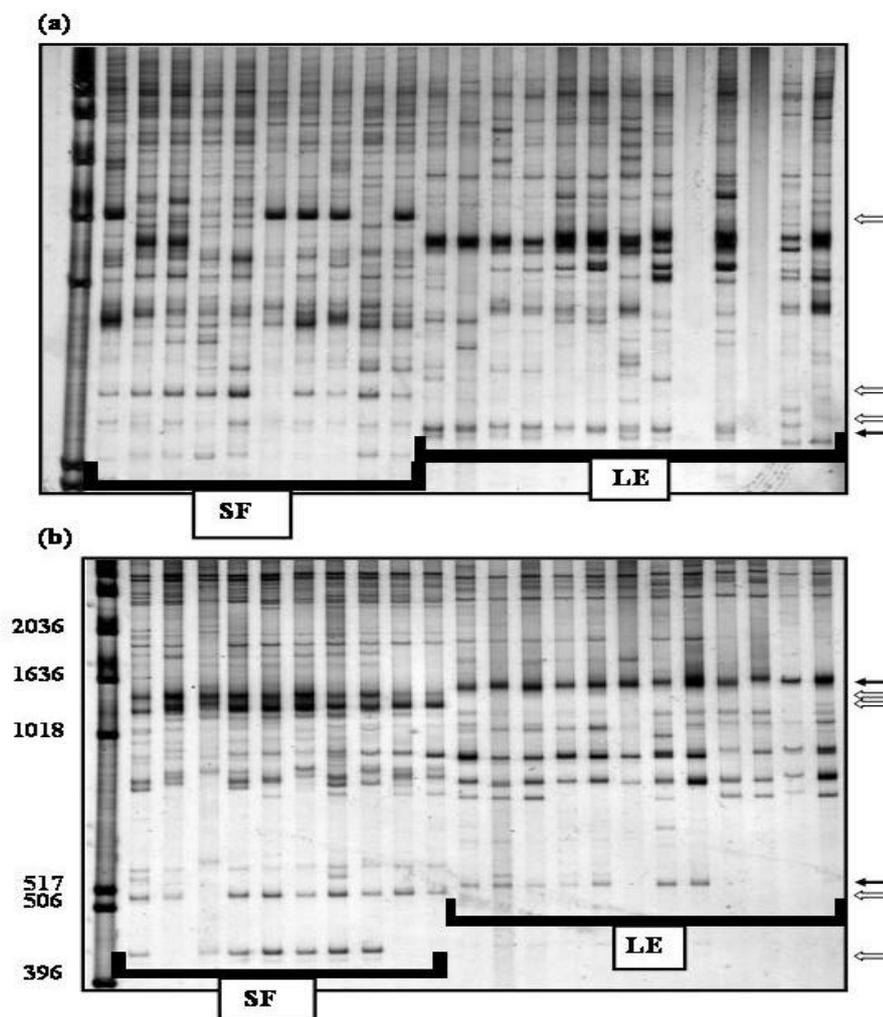


Fig. 4. Géis de poliacrilamida com amostras do grupo São Francisco (SF) e grupo Leste (LE) amplificados com primers RAPD C16 (a) e C12 (b) da Operon Technologies. As setas brancas indicam bandas exclusivas de SF e setas pretas indicam bandas exclusivas de LE. Os números a esquerda indicam o número de pares de bases revelado pelo marcador molecular (1Kb ladder, BRL, Gibco).

O padrão de variação dos alelos RAPD permitiu a separação das amostras em dois grupos bem definidos, suportados por alto valor de bootstrap (Figura não apresentada). O primeiro grupo apresentou 58 indivíduos presentes do rio Buranhém ao rio São Francisco, chamado doravante de ‘grupo São Francisco’ (SF). O segundo grupo apresentou 51 espécimes distribuídos entre os rios Perequê e Jucuruçu, (ver Figura 5), sendo referido então como ‘grupo Leste’ (LE). Utilizando os citados grupos como unidades a serem comparadas, SF apresentou 15 bandas exclusivas, enquanto LE apresentou 11 bandas restritas às suas populações. Os valores de bootstrap apresentaram-se, em geral, pequenos dentro dos grupos. Exceções a este padrão puderam ser observadas apenas em agrupamentos terminais como Itabapoana – São João e Contas – Pardo.

O Teste Exato de Fisher revelou diferenças significativas na comparação de pares entre os grupos SF e LE, corroborando a consistência geográfica a partir das distâncias genéticas de Nei (1972) (Tabela 2). Valores não significativos entre populações do São Francisco e algumas populações de LE (ex: JU, IN e RI) podem ser resultado da baixa amostragem destas (Tabela não apresentada).

Uma reanálise, incluindo apenas bacias com $N \geq 5$, permitiu a proposição de um fenograma com valores de bootstrap internos maiores, excluindo possíveis efeitos de amostragem em algumas populações (Figura 5).

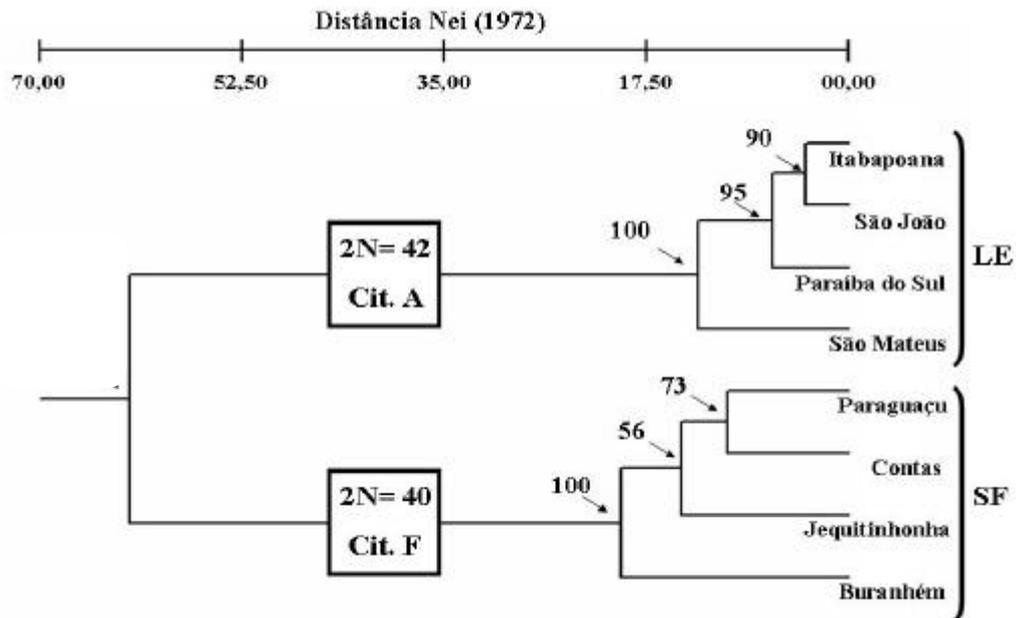


Fig. 5. Fenograma obtido por UPGMA evidenciando as relações entre populações de *H. malabaricus* das bacias hidrográficas com $N \geq 5$, e valores de bootstrap associados.

Tabela 2. Valores de probabilidade obtidos a partir do Teste Exato de Fisher (1000 permutações e 50 repetições) para populações de *H. malabaricus*. Em sombreado, os valores de probabilidade associados aos pares de bacias pertencentes aos grupos São Francisco (PA-BU) e Leste (SM-SJ).

	PA	CO	JQ	BU	SM	IT	PS	SJ
PA	...							
CO	<0,001	...						
JQ	<0,001	<0,001	...					
BU	<0,001	0,0122	0,002	...				
SM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	...			
IT	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	...		
PS	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,364	1,0	...	
SJ	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,008	1,0	1,0	...

DISCUSSÃO

A separação das populações costeiras em dois grupos é concordante com os dados cariotípicos conhecidos para *Hoplias malabaricus*. O grupo LE, com maior número de populações caracterizadas sob o ponto de vista citogenético, apresenta apenas populações com número diplóide de $2n= 42$ cromossomos, embora possam apresentar os citótipos A e B (Bertollo *et al.*, 2000). O grupo SF é compreendido por espécimes com número diplóide $2n= 40$, indicado por Bertollo *et al.* (2000) como citótipo F (ver figura 5). Este citótipo ocorre nos rios Pardo e Jequitinhonha, próximo a drenagens de LE. Entretanto, segundo Dergam (1996) o citótipo F é aparentado molecularmente com populações amazônicas. Este citótipo também apresenta semelhanças citológicas com o citótipo G, endêmico da bacia amazônica (Bertollo *et al.*, 2000). Considerando estes dados e a pesar da proximidade geográfica, os citótipos A, B e F não representam um grupo monofilético e as populações de SF e LE diferenciaram-se alhures na região neotropical.

Em contraste com as condições de simpatria de citótipos até hoje detectadas nas bacias do Paraná (Scavone *et al.*, 1994 ; Dergam, 1996), Paraguai, São Francisco e da região amazônica (Bertollo *et al.*, 2000), as bacias costeiras caracterizam-se por apresentar alopatria de citótipos em cada bacia. Evidências circunstanciais apontam para a possibilidade de que mesmo a condição de simpatria no alto São Francisco seja, de fato, um efeito antrópico. Assim, Moreira-Filho (2005) indicou grande grau de semelhança entre citótipos de *Apareiodon ibitiensis* e *A. piracicabae* do rio Paraná com *Apareiodon* sp. A e *Apareiodon* sp. B, respectivamente, encontradas no rio São Francisco. Segundo o autor, o resultado sugere tratar-se das mesmas espécies ocorrentes em ambas as bacias como resultado de uma transposição do rio Piumhi, então afluente do rio Grande, para o rio São Francisco. Esta transposição pode ter determinado a presença do citótipo A de *H. malabaricus* em águas do São Francisco, mas estudos complementares nas populações dos rios Grande e alto São Francisco serão necessários para confirmação desta hipótese.

A ausência de populações geneticamente semelhantes ao grupo LE ao longo da bacia do rio São Francisco sugere que SF e LE se desenvolveram em condições alopátricas,

ou seja, a distribuição contemporânea dos grupos São Francisco e Leste só foi estabelecida após a consolidação de barreiras geográficas (separação entre as bacias) que limitam a dispersão de *H. malabaricus*.

A variação genética entre as bacias, internas aos grupos SF e LE deve-se a eventos de dispersão e vicariância ocorridas, provavelmente, em períodos glaciais pleistocênicos (Weitzman *et al.*, 1988; Beheregaray *et al.*, 2002). Estes processos podem ser suficientemente recentes, o que explicaria menores valores de bootstrap nos nodos internos dos grupos.

As barreiras geográficas

Que processos podem explicar o fato de que populações geograficamente próximas possam ter histórias evolutivas independentes? Considerando os dados citogenéticos, as traíras dos rios Pardo e São Francisco estão mais aparentadas às traíras do Tocantins e Suriname do que àquelas dos rios Doce e Mucuri.

O sistema hidrográfico da costa leste do Brasil é caracterizado por um grande número de rios relativamente pequenos, limitados ao oeste pela Serra do Mar e com desembocaduras, às vezes, muito próximas. Neste cenário, eventos de regressão marinha durante episódios glaciais poderiam resultar na dispersão da ictiofauna entre bacias adjacentes através de grandes regiões lagunares formadas na foz de bacias, até então independentes. Já a transgressão oceânica, avanço das águas sobre o continente, resultaria na vicariância entre as populações anteriormente dispersas, favorecendo sua diversificação alopatrica (ex. Beheregaray *et al.*, 2002). O modelo de refúgios pleistocênicos (Haffer, 1982), é freqüentemente citado para explicar a diversidade da fauna Neotropical, mas sua aplicação na diversificação da ictiofauna, que trata principalmente de grandes separações temporais, parece restrita (Weitzman & Weitzman, 1982). No final do Mioceno médio (aprox. 10 M.a.) a fauna de peixes neotropicais já era essencialmente moderna e, conseqüentemente, o modelo de refúgios poderia ser válido apenas para eventos cladogenéticos terminais (Weitzman & Weitzman, 1982; Lundberg *et al.*, 1998).

A drástica diferenciação genética entre as populações costeiras de *H. malabaricus* entre os grupos SF e LE coincide com a ocorrência de um notável alargamento da plataforma continental, formando duas saliências costeiras submersas, decorrentes do

desenvolvimento de formações de bancos de corais e rochas sedimentares sobre um substrato vulcânico, o “vulcanismo Abrolhos”. Estas saliências da plataforma continental recebem as denominações de Banco Abrolhos e Banco Royal Charlotte (Figura 6) e alcançam 246km e 110km de alargamento, respectivamente, em seus pontos mais extremos (Guazelli & Carvalho, 1981). Este complexo possui uma idade estimada entre 37-59 M.a. (Eoceno) (Mizusaki *et al.*, 1994) e deve ter funcionado como uma barreira física à conexão entre a ictiofauna das bacias de SF, em sua porção setentrional, com as bacias de LE, ao sul.

Feições batimétricas da plataforma continental em Abrolhos apresentam um complexo de altos topográficos associados a paleocanais esculpidos pela drenagem fluvial pleistocênica (Kowsmann & Costa, 1979). Esta topografia sugere a confluência de drenagens contemporâneas sob o Banco Abrolhos, permitindo a dispersão da ictiofauna, entre rios adjacentes a este, durante períodos glaciais. A exposição da plataforma continental, ao término da Regressão de Wisconsin, por exemplo, pode ser inferida pela acentuada pigmentação de óxido de ferro nos sedimentos vizinhos à costa (Costa, 1974). No Banco Abrolhos a feição apresentada por depressões batimétricas permite comprovar a mudança de ambientes causada pela Transgressão Flandriana (14-7 mil anos). Tais depressões são delimitadas pela isóbata atual de 60 m e circundadas por altos topográficos que chegam a atingir a isóbata de 30 m (Figura 7a). Vários canais convergem para a Depressão Abrolhos, a qual comunica com o talude através de um canal largo e profundo (Kowsman & Costa, 1979). A amostragem de lama terrígena com fauna mixoalina evidenciou que a Depressão Abrolhos se comportou temporariamente como laguna, durante a Transgressão Flandriana, até menos de 8 mil anos, quando cessou a deposição terrígena e começou a deposição calcária marinha (Vicalvi *et al.*, 1978).

Ao mesmo tempo em que a elevação de Abrolhos permite que canais hidrográficos se encontrem durante a exposição da plataforma continental, este relevo também deve funcionar como barreira entre bacias da costa leste. Rios como o Mucuri e Doce drenam para a depressão Abrolhos (Figura 7), formando uma grande região lagunar. De forma análoga, rios como o Buranhém e o Jequitinhonha podem coalescer durante períodos de regressão marinha, entre veios que adentram o Banco de Royal Charlotte. A separação

destas paleodrenagens por elevações da plataforma continental entre os Bancos, impediria, então, a conexão entre a ictiofauna de SF e LE adjacentes a esta plataforma.

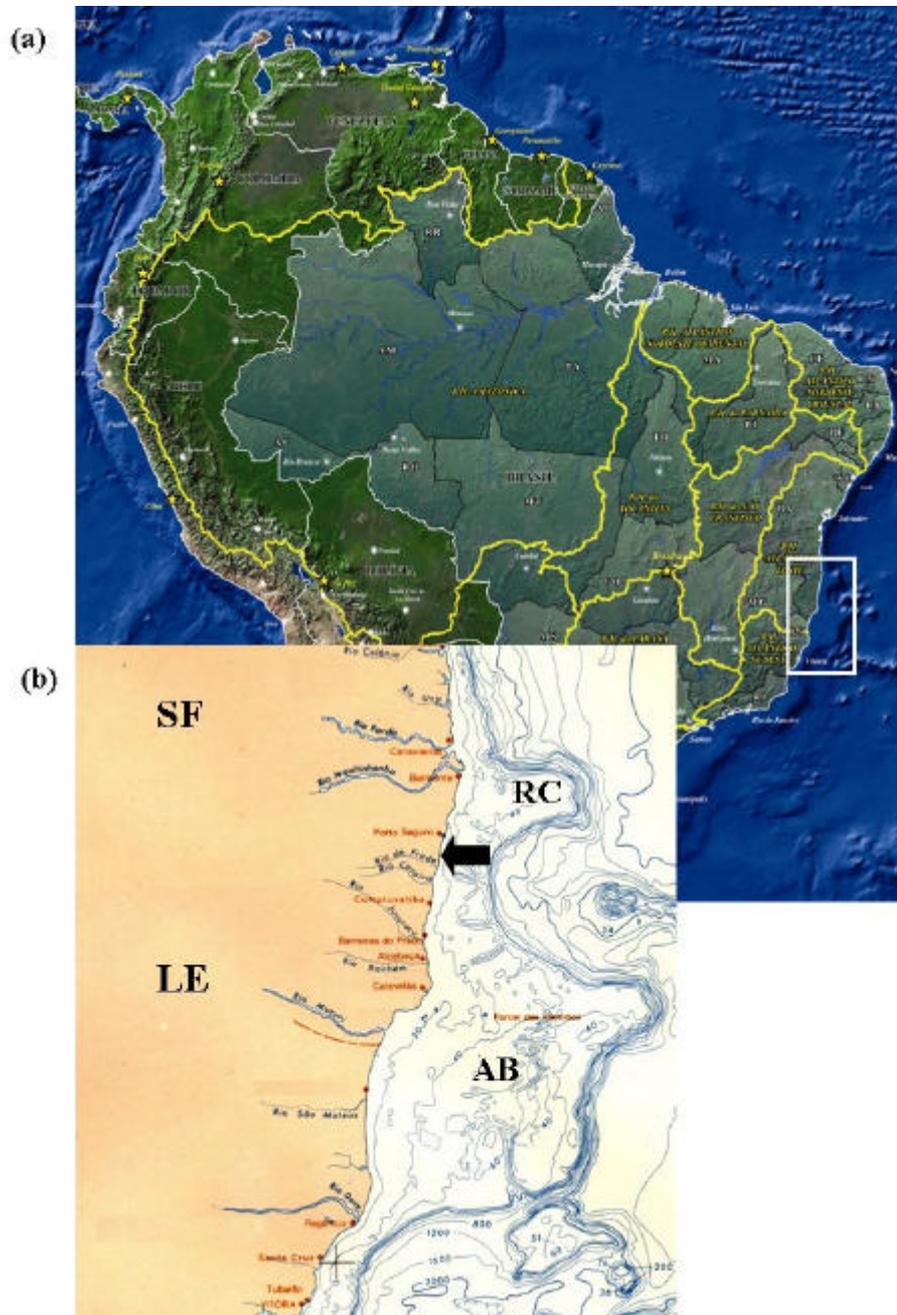


Fig. 6. (a) Subdivisão hidrográfica apresentada pela ANA com destaque para o prolongamento da plataforma continental na região dos Bancos Abrolhos (AB) e Royal Charlotte (RC), figura b. A seta indica a região aproximada de separação entre as bacias dos grupos SF e LE. Figuras modificadas a partir de www.ana.gov.br (a) e Palma *et al.* (1979).

Além disso, segundo Carlos E. Schaefer (DPS- UFV, comunicação pessoal) a extensa exposição da plataforma continental em condições climáticas bem mais secas não permitiria a conexão entre bacias adjacentes, e condições de aridez seriam preponderantes durante as fases de regressões marinhas nestas projeções continentais, então aflorantes, em função da não existência de paleocanais na parte mais externa ao Banco. A predominância de elementos carbonáticos e baixa incidência de sedimentos terrígenos (depósitos de origem fluvial) na plataforma continental entre Macau- RN e Vitória- ES pode ser atribuída à semi-aridez vigorante na região costeira e no interior, determinando uma rede de drenagem intermitente e com baixa taxa de sedimentação (Kowsmann & Costa, 1979). Além disso, pequenas drenagens costeiras distanciadas do complexo cristalino continental podem ter secado durante a regressão Wisconsiniana (60-14 mil anos), como Peruípe e Itanhém ao sul da Bahia. Esta condição de aridez ainda pode ser sugerida pela presença de sedimentos formados pela evaporação de águas hipersalinas em sistemas lagunares no Banco Abrolhos. Esta combinação de clima seco e lagunas hipersalinas pode ter funcionado, então, como uma barreira para dispersão da ictiofauna de água doce.

As hipóteses de separação por paleocanais divergentes e interrupções do sistema hídrico provocado por condições áridas, não são exclusivas. Elevações da plataforma de Abrolhos certamente tiveram fundamental importância para separação de SF e LE em períodos de regressão marinha. Já as condições áridas podem ter impedido o contato entre rios menores, a princípio não delimitados pelos paleocanais presentes na plataforma continental. Este ambiente foi certamente inóspito, funcionando como eficiente barreira à dispersão de traíras ao norte e ao sul de Abrolhos.

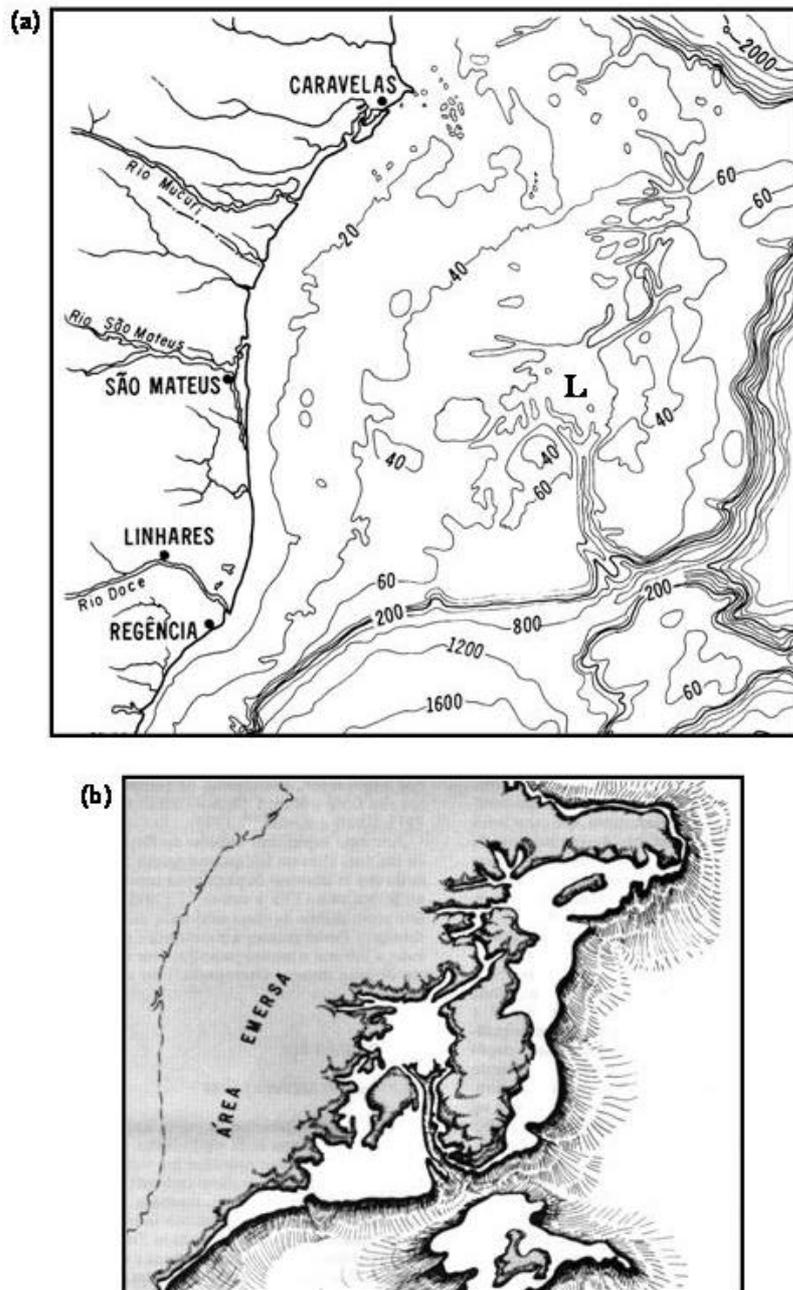


Fig. 7. (a) Mapa batimétrico da plataforma continental de Abrolhos. O 'L' indica a delimitação de uma laguna, visualizada na figura b, pelas isolinhas de 60 metros. (b) Paleogeografia da plataforma continental dos Abrolhos há 11.000 anos, durante a estabilização do mar a -60 metros. Em tracejado a linha da costa atual. Modificado a partir de (Kowsmann & Costa, 1979).

Comparação com outros táxons

Na região neotropical, o uso dos dados de distribuição de espécies esbarra no reconhecimento de unidades morfológicas às vezes não muito bem definidas taxonomicamente e na distribuição desequilibrada de dados entre as bacias (Vari & Weitzman, 1990). Apesar destes problemas, o padrão biogeográfico sugerido a partir dos dados de RAPD é corroborado pela distribuição de várias espécies de peixes de água doce. Espécies como *Steindachnerina elegans* e *Prochilodus hartii* possuem seu limite sul nos rios Jequitinhonha e Buranhém, enquanto *Astyanax taeniatus*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Mimagoniates microlepis*, *Corydoras nattereri* e *Trachelyopterus striatulus* possuem seu limite norte próximo aos rios Mucuri e Jucuruçu (Anexo 02).

A ocorrência de uma mesma espécie em ambas as áreas de abrangência dos grupos SF e LE (ou seja de forma incongruente com a distribuição das traíras) pode resultar de quatro condições básicas: (i) a ausência de um monofiletismo para o grupo, como ora observado em *Hoplias malabaricus*; (ii) a presença do táxon precedendo a formação de barreiras; (iii) a dispersão antrópica e; (iv) a condições de coalescência de bacias costeiras que representem filtros para algumas espécies como a traíra.

Como exemplo, as espécies de ampla distribuição como *Astyanax fasciatus*, *Rhamdia quelen* e *Gymnotus carapo* ocorrem em toda América do Sul e Central, podendo ser interpretadas como grupos antigos cuja dispersão entre as bacias precede eventos históricos de vicariância. Estas espécies aparecem como redundantes em hipóteses biogeográficas baseadas em filogenias de grupos, não sendo possível distinguir entre os padrões acima sem a proposição de uma hipótese filogenética intraespecífica. Análises moleculares, porém, também indicam altos níveis de diversidade genética nas populações de *Rhamdia quelen* na América Central (Perdices *et al.*,2002).

A co-ocorrência de espécies em SF e LE pode ser explicada, principalmente, por uma ligação através da bacia do rio São Francisco. Espécies como *Cyphocharax gilbert* e *Prochilodus vimbooides* apresentam-se distribuídas em SF e LE (Vari, 1988; 1992; Castro & Vari, 2003), estando também presentes ao longo do rio São Francisco. A ligação entre estas pode ser inferida por encontro de cabeceiras como no rio Doce e afluentes do rio São

Francisco, o que explicaria a distribuição de espécies como *Oligosarcus argenteus* (Menezes, 1988) e *Trichomycterus brasiliensis*.

A presença de *Leporinus thayeri*, *Rachoviscus graciliceps* e *Steindachneridion parahybae* em SF e LE não pode, a princípio, ser correlacionada com uma dispersão sanfranciscana. Estas espécies não ocorrem na bacia do rio São Francisco e o argumento de dispersão por esta bacia implicaria em um evento posterior de extinção local. De forma análoga, *Oligosarcus macrolepis* também não corrobora a hipótese de alopatria entre as ictiofaunas, provocada por Abrolhos. Este caraciforme encontra-se restrito às bacias dos rios Jequitinhonha e Pardo (SF), mas a ausência de uma espécie do mesmo gênero amplamente distribuída na bacia do rio São Francisco, aliado a distribuição das demais espécies do gênero em LE (Menezes, 1988), também implicaria em um evento de extinção pós-dispersão. Se, por outro lado, as espécies de *Oligosarcus* fossem capazes de transpor uma barreira para traíras, esperaria-se que a espécie filogeneticamente mais próxima de *O. macrolepis* fosse *O. acutirostris*, de ocorrência logo ao sul do Banco Abrolhos. Já uma proposta de filogenia que aproxime *O. macrolepis* de *O. argenteus*, presente na bacia do rio Doce e alto São Francisco, suportaria um evento de dispersão e extinção santfranciscana.

CONCLUSÃO

Populações de *Hoplias malabaricus* da costa leste do Brasil apresentam dois padrões distintos de alelos RAPD-PCR, sendo o primeiro distribuído entre as bacias dos rios Buranhém e São Francisco (grupo São Francisco) e o segundo entre as bacias dos rios Perequê e Jucuruçu (grupo Leste).

A separação geográfica sugerida por padrões moleculares é corroborada pela distribuição das espécies de peixes de água doce nas bacias costeiras. Este padrão alopátrico existente entre a ictiofauna e populações de traíras pode ser explicado pelas feições geomorfológicas e condições climáticas ocorrentes no Banco Abrolhos, as quais agiram impedindo a dispersão entre as ictiofaunas costeiras ao norte e ao sul do Banco, durante os períodos glaciais.

A concordância entre dados independentes, como a divergência genética e citogenética em *Hoplias malabaricus*, assim como o padrão de distribuição de espécies de peixes costeiros sugere que fatores históricos compartilhados por diferentes linhagens tiveram um importante papel na distribuição contemporânea da diversidade ictiofaunística da costa leste brasileira. Temporalmente, este processo de vicariância parece ser mais recente que os processos de diferenciação cariotípica dentro do complexo *H. malabaricus*. O reconhecimento de unidades biogeográficas propostas com base em caracteres sistemáticos de base genética e independente representa um evidente avanço no critério atual de reconhecimento de conjuntos de bacias, e poderá servir de subsídio em futuros planos de conservação e manejo destas unidades.

CAPÍTULO 2

Filogeografia de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei: Erythrinidae) na costa leste do Brasil

INTRODUÇÃO

A região neotropical apresenta a maior diversidade de espécies de peixes de água doce do mundo, com aproximadamente 4.500 espécies conhecidas e um número estimado de 1.550 a serem descritas (Reis *et al.*, 2003). Schaefer (1998), baseado em tendências históricas de descrição de espécies em Characidae e Loricariidae, estima que existam cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais, as quais representariam cerca de 25% da ictiofauna mundial presente em menos de 0,003% da água do planeta.

Além da grande estimativa de espécies desconhecidas, a compreensão da evolução desta ictiofauna também permanece limitada. Em 1998, Vari e Malabarba relataram que, para a maioria dos principais grupos de peixes de água doce Neotropicais, as hipóteses filogenéticas estão restritas a questões relacionadas a níveis taxonômicos superiores. Após sete anos, as questões relacionadas a níveis taxonômicos inferiores permanecem sem resposta, com a inclusão de um grande número de gêneros e espécies na categoria de *incertae sedis* em uma recente revisão dos peixes de água doce neotropicais (Reis *et al.*, 2003). Novos estudos têm procurado resolver questões em famílias, como Doradidae (Moyer *et al.* 2004) e Callichthyidae (Shimabukuro-Dias, *et al.* 2004), mas a resolução de níveis taxonômicos inferiores ainda envolve, na maioria das vezes, grupos com menos espécies.

O conhecimento dos componentes históricos da ictiofauna é de grande importância para elaboração e implementação de planos de conservação da biodiversidade, restauração

ecológica e manejo de recursos pesqueiros. A necessidade da incorporação da dimensão evolutiva e ecológica é justificada pela tendência atual das biológicas da conservação e restauração, as quais enfatizam a necessidade da manutenção dos processos ecológicos e evolutivos que determinaram o padrão de biodiversidade observado no ecossistema (Meffe & Carroll, 1994). No entanto, problemas no reconhecimento e distribuição de táxons a nível específico e o esparso conhecimento da história filogenética de táxons supra-específicos, limitam a precisão de hipóteses biogeográficas para os peixes de água doce na América do Sul (Vari & Weitzman, 1990). As lacunas no conhecimento desta ictiofauna são particularmente lamentáveis devido a grande aceleração de impactos antropogênicos sobre os sistemas aquáticos neotropicais e os peixes que os habitam.

A abordagem filogeográfica

O desenvolvimento da PCR (Mullis & Faloona, 1987) e, sobretudo, o desenvolvimento de um conjunto de técnicas moleculares e computacionais ampliaram a perspectiva de estudos que levassem em conta a história filogenética tanto de populações quanto de grupos de nível taxonômico superior.

Em 1987, Avise *et al.* cunharam o termo filogeografia para descrever um novo campo de estudo, com raízes na biogeografia, que objetiva entender os componentes responsáveis pela separação de linhagens num contexto temporal e geográfico. O trabalho com dados predominantemente mitocondriais (mtDNA) permitiu a reunião de informações num escopo comparativo interdisciplinar (Bermingham & Moritz, 1998), possibilitando estudos sobre especiação (ex. Beheregaray *et al.*, 2002) e os reflexos de fenômenos de vicariância relacionados à hidrobiologia (ex. Montoya-Burgos, 2003). A ubiquidade do mtDNA entre os diferentes organismos, sua estrutura genética simples, herança clonal, a existência de apenas uma cópia por organismo e rápidas taxas mutacionais permitem que esta molécula seja particularmente apropriada para estudos de filogenia (Avise, 1987; 2000). Apesar da larga utilização do mtDNA em estudos filogeográficos, outros tratamentos que vinculem filogenia à distribuição de traços genéticos (morfologia, comportamento, DNA nuclear), podem ser qualificados como filogeografia, considerando a etimologia do termo (Avise, 1998).

Anteriormente ao desenvolvimento da filogeografia como disciplina, os estudos biogeográficos caracterizavam-se por duas abordagens: a fenética, que compara a presença ou ausência de “espécies morfológicas” para estabelecer semelhanças entre as bacias (ex. Menezes, 1972; Bizerril, 1994) ou com base na distribuição de táxons endêmicos ou de distribuição restrita (Vari, 1988). No entanto, táxons de ampla distribuição, considerados como pouco informativos em ambas abordagens, são de primordial relevância para estudos de cunho filogeográfico (Avise, 2000).

Com o uso de caracteres com base genética, estudos de filogeografia permitem o reconhecimento de grupos monofiléticos num contexto espaço-temporal, o que contribui a uma compreensão mais objetiva da relação histórica entre diferentes áreas. Os padrões filogeográficos representam hipóteses que podem ser corroboradas com padrões co-variantes de grupos não aparentados, provavelmente refletindo uma história comum que afeta toda uma região (Nelson & Platnick, 1981). De fato, a ausência de idiosincrasias genealógicas, considerando-se a diversidade de fatores ecológicos e evolutivos agindo sobre a história demográfica e genética de diferentes espécies, deve refletir um sinal filogeográfico da biota, sendo seu entendimento de grande relevância para biologia da conservação (Avise, 1992).

Peixes de água doce são, em geral, ótimas ferramentas para a investigação do passado geomorfológico e de modificações ambientais. Devido à incapacidade de sobrevivência fora do ambiente aquático, a dispersão de peixes entre diferentes corpos d’água depende da conexão direta entre estes, devendo refletir as mudanças geológicas e ambientais ocorridas numa região. Embora a escala temporal destes eventos ou processos possa ser extremamente variável, estes níveis de divergência podem ser reconstruídos com níveis de divergência do mtDNA (ex. Bermingham & Martim, 1998; Sivasundar *et al.*, 2001; Montoya-Burgos, 2003).

O Relógio Molecular

A estimativa do tempo de divergência entre clones de mtDNA, baseada na porcentagem de divergência genética numa escala temporal, tem sido considerada uma das contribuições mais importantes dos dados moleculares para o entendimento de processos evolutivos (Hillis *et al.*, 1996). A distância entre duas seqüências de DNA pode ser

estimada, de forma direta, contando-se o número de bases substituídas entre as seqüências. A denominada “calibragem do relógio molecular” é realizada a partir do conhecimento de dados paleontológicos e/ou geomorfológicos que permitam hipotetizar o tempo de vicariância entre as populações ou espécies. Assim, a taxa de substituição de nucleotídeos (r), ou seja, o número de substituições que ocorrem por sítio por unidade de tempo, pode ser calculado segundo a expressão proposta por Li (1997)

$$r = k / 2T,$$

onde k é o número de substituições por sítios entre duas seqüências homólogas e T é o tempo de divergência entre essas duas seqüências, geralmente estimado indiretamente por evidências fósseis ou por hipóteses geomorfológicas. Quando as taxas de substituição do DNA são homogêneas ao longo das linhagens e do tempo, a cronologia dos eventos de vicariância e diversificação podem ser estimados a partir de suas distâncias genéticas e comparadas a eventos geológicos conhecidos (Bermingham & Avise, 1986; Page, 1996).

Entre os grupos de peixes estudados num contexto filogeográfico das bacias sul-americanas encontra-se a traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). Esta espécie destaca-se principalmente por sua ampla distribuição no continente e seu hábito sedentário, o que permite uma relativa diferenciação genética entre populações. Sua ocorrência nas grandes bacias brasileiras e a distribuição de formas cariotípicas como os citótipos A e C em drenagens como Paraná e Amazonas, apontam para uma diversificação que antecederia o Mioceno. Dergam *et al.* (não publicado), com uso de mtDNA e calibração do relógio molecular para o gene citocromo b, sugerem que os citótipos com $2n=40$ e $2n=42$ divergiram há 47-39 milhões de anos, no Eoceno.

Na verdade, grande parte dos estudos filogeográficos baseados na ictiofauna neotropical são realizados em nível de grandes bacias hidrográficas. Sivasundar *et al.* (2001) e Montoya-Burgos (2003) sugerem a filogenia para peixes dos gêneros *Prochilodus* e *Hypostomus*, respectivamente, relacionando a diversificação da ictiofauna neotropical à dimensão temporal e geográfica de vicariância entre as grandes bacias da América do Sul. Dergam *et al.* (não publicado) utilizam o mesmo contexto para discutir a diversificação do complexo *Hoplias malabaricus* no continente, enquanto Bermingham e Martin (1998) e Perdices *et al.* (2002) aplicam o relógio molecular geral estimado a partir de diferentes

clados, para hipotetizar a evolução de peixes de água doce da América Central. Já em uma escala mais regional, Beheregaray *et al.* (2002) relaciona as variações dentro do complexo *Odontesthes perugiae* às variações pleistocênicas, no sistema costeiro do Rio Grande do Sul.

O modelo de diversificação pleistocênico também é evocado por Menezes (1988) e Melo (2000) para explicar a variedade e distribuição de espécies de *Oligosarcus*, *Astyanax* e *Deuterodon*, respectivamente, ao longo da costa leste brasileira. Considerando a região neotropical, a fauna de peixes neotropicais já era essencialmente moderna no final do Mioceno médio (revisado em Lundberg, 1998), sugerindo que o modelo de refúgios, na sua versão atual, seja aplicável apenas para eventos cladogenéticos terminais (Weitzman & Weitzman, 1982; Lundberg *et al.*, 1998).

Hipóteses plausíveis sobre o relógio molecular em táxons neotropicais de ampla distribuição são de grande importância para a compreensão dos efeitos dos processos geomorfológicos antigos versus recentes na distribuição da diversidade de peixes de água doce neotropicais.

Com o objetivo de determinar se o padrão de variação molecular das populações de traíras pode ser explicado por efeitos das glaciações pleistocênicas agindo em todo o litoral, ou se as causas correspondem a fatores de escala temporal maior, foram realizadas estimativas de divergência molecular baseadas em haplótipos de mtDNA. Este trabalho representa a primeira proposição de divergência, com base no relógio molecular, em populações de peixes com ampla distribuição na costa leste do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 147 amostras obtidas em 19 bacias compreendidas entre a bacia do rio São Francisco, ao norte, e a bacia do rio Uruguai, ao sul (Tabela 3 e Figura 12). Segundo Dergam (1996), populações da bacia do Paraná e do rio Uruguai representam o grupo basal para os citótipos 2n=40 e 2n=42. Já as amostras do rio São Francisco apresentam um citótipo, com morfologia cromossômica semelhante ao encontrado nas bacias dos rios Pardo e Jequitinhonha. O conhecimento das relações de parentesco entre populações destas bacias é fundamental para o entendimento dos padrões de diversificação do complexo *H. malabaricus* na costa leste do Brasil.

Foram analisadas amostras de fígado, músculo epaxial ou filamentos branquiais retirados do lado direito dos espécimes, fixados em etanol absoluto e estocados a -20° C. A tabela 3 apresenta o número de indivíduos analisados para cada bacia (n total= 147).

As extrações foram processadas a partir de modificações do protocolo de Boyce *et al.* (1989), utilizando-se o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetil amônio). O DNA foi ressuspendido em Tris-HCl 1M- EDTA 0,5M pH 8,0 (filtrado e estéril) e estocado à -20°C até o momento da amplificação.

Uma análise prévia da variabilidade dos segmentos mitocondriais foi feita por meio de padrões de polimorfismo de conformação de fita simples (Single Strand Conformation Polymorphism - SSCP) (Orita *et al.*, 1989; Hayashi, 1991), em um fragmento de 400 pares de bases do gene 16S ribossomal mitocondrial, como forma indireta de avaliação da variabilidade da ATP sintase, com uso dos primers L2510 (5`-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3`) e Nested 4042 (5`-GGA TCT TTT GGT CAG AAK- 3`), sugerido por Dergam *et al.* (2002).

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 20 µL { 14,2 µL de H₂O; 2 µL de tampão 10X [500 mM KCl (cloreto de potássio), 100 mM Tris-HCl]; 0,4 µL de MgCl₂ (cloreto de magnésio) 100 mM; 0,2 µL dNTPs (desoxiribonucleotídeos trifosfatados) 20 mM; 1 µL de cada primer; 0,2 µL de Taq polimerase (1 unidade) e 1µL de DNA da amostra} e amplificados em 35 ciclos com temperatura de anelamento igual a 54° C. Os segmentos amplificados foram adicionados a um tampão desnaturante (formamida 95%), as

amostras foram aquecidas a 94° C por 4 minutos, sendo, em seguida, aplicadas a um gel de poliacrilamida 8%, correndo 16 hs a 60 v e visualizadas com precipitação de nitrato de prata.

Tabela 3. Populações de *H. malabaricus* representadas no presente estudo e respectivo número amostral. A bacia do rio Uruguai foi definida em dois trechos, compreendendo alto e baixo Uruguai à jusante e à montante da desembocadura do rio Aguapey na margem direita (lado argentino) do rio Uruguai.

Local	Sigla	UF	(n)
São Francisco	SF	MG	03
Paraguaçu	PA	BA	19
Contas	CO	BA	11
Pardo	PD	MG	04
Jequitinhonha	JQ	MG	20
Buranhém	BU	BA	06
Jucuruçu	JU	MG	02
Itanhém	IN	BA/ MG	03
Mucuri	MU	MG/ ES	03
São Mateus	SM	ES	10
Doce	DO	MG	04
Itabapoana	IT	RJ	08
Paraíba do Sul	PS	MG/ RJ	10
Macaé	MA	RJ	02
São João	SJ	RJ	06
Macacu	MC	RJ	02
Ribeira de Iguape	RI	SP	03
Perequê	PE	PR	03
Alto Uruguai	uUR	SC	09
Baixo Uruguai	lUR	RS/ Uruguai	19

A análise de fragmentos baseados na conformação da fita desnaturada do DNA permite a discriminação de seqüências com poucos pares de bases divergentes uma vez que a composição de nucleotídeos irá determinar o padrão de dobramento da fita simples, gerando estruturas terciárias diferenciadas através da eletroforese (Hayashi, 1991). Este método permite uma análise populacional menos onerosa, de um grande número de espécimes, necessário devido aos altos custos do seqüenciamento. Uma amostra de cada fenótipo de SSCP foi selecionada. Quando um único padrão SSCP foi detectado em uma população superior a cinco indivíduos, foram seqüenciadas duas amostras com o mesmo padrão. Indivíduos com aparentemente o mesmo padrão SSCP, mas provenientes de diferentes locais, também foram seqüenciados. As amostras provenientes das bacias dos rios São Francisco e Doce foram previamente selecionadas por Dergam (1996; 2002) e não foram submetidas à análise do padrão de fita simples neste trabalho.

Os segmentos da região ATP sintase 6-8, escolhidos a partir da análise do padrão de fita simples, foram amplificados com o uso dos primers L8524 (5' –AAAY CCT GAR ACT GAC CAT G- 3') e H9236 (5' –GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC- 3'), sendo as reações de PCR realizadas em três volumes de 40 µL [28,4 µL de H₂O; 4 µL de tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl); 0,8 µL de MgCl₂ 100 mM; 0,4 µL dNTPs 20 mM; 2 µL de cada primer; 0,4 µL de Taq polimerase e 2µL de DNA] para cada amostra. Os fragmentos de mtDNA foram amplificados em 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 64° C e 1 minuto a 72° C, com uma desnaturação inicial do DNA a 95° C por 3 minutos e uma extensão final dos segmentos amplificados a 72° C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram identificados conforme o peso molecular esperado, utilizando como padrão o marcador molecular de 1Kb DNA ladder (Gibco BRL Products).

O DNA amplificado foi purificado com uso de colunas QIAquick, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Neste protocolo as moléculas DNA fixam-se a uma membrana de sílica sob alta concentração salina enquanto os contaminantes (produtos restantes da reação de PCR como DNA polimerases) são filtrados através da coluna sob força centrífuga. O DNA foi enviado para Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília DF- e seqüenciado em um aparelho ABI 3700.

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos foi realizado com o programa Mega 3 (Kumar *et al.*, 2004 www.megasoftware.net) (Figura 8) e as análises de Máxima

Parsimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (maximum likelihood, ML) foram obtidas com o programa PAUP 4 (Phylogenetics Analysis Using Parsimony) (Swofford, 2003). A análise de MP foi realizada com emprego de diferentes pesos para primeira posição de cada códon e para transversões. Tais modificações são úteis dado que determinadas porções das seqüências nucleotídicas apresentam maior probabilidade de mutações neutras e, conseqüentemente, podem ser homoplásicas. A mesma análise foi realizada sem a aplicação de pesos, sendo as diversas árvores comparadas quanto a suas topologias e suporte estatístico.

O método de ML é realizado a partir da escolha de um modelo de substituição nucleotídica. Para tal, um teste de ajuste das seqüências foi realizado com uso do programa Modeltest (Posada & Crandall, 1998), sendo o modelo escolhido utilizado para gerar estimativas de distância e de máxima verossimilhança. Para escolha do modelo de substituição nucleotídica, escores (log-likelihood) de uma mesma árvore podem ser calculados sob modelos evolucionários progressivamente mais complexos, e comparados estatisticamente através da estatística LRT (log-likelihood ratio, $= -2 \log$) e o seu valor de probabilidade associado. O valor deste ajuste permite aceitar o modelo molecular que mais se adequa ao padrão de variação de DNA dos dados.

Em todas as análises foi utilizado o bootstrap como teste de confiança de topologias (Efron, 1985). A base do método consiste de uma simples reamostragem com reposição pseudoaleatória dos dados. A cada reamostragem uma árvore réplica é construída, com a árvore final apresentando os valores de repetição para cada ramo. Para realização do bootstrap foram adotadas 100 repetições, com a topologia final apresentando valores apenas superiores a 50%.

As divergências entre os clados foram calculadas como a média das divergências pareadas entre seqüências individuais e a calibragem de divergência de seqüências foi feita conforme dados do gene ATPase obtidos por Sivasundar *et al.*, (2001) (ver discussão, relógio molecular).

O padrão obtido para as populações de *H. malabaricus* foi comparado com os dados citogenéticos conhecidos para esta espécie. Quando os grupos de haplótipos incluíram populações com dados cariotípicos conhecidos, assumiu-se que os haplótipos restantes de cada clado apresentam o mesmo citótipo. Tais dados foram, ainda, comparados a

RESULTADOS

Foram seqüenciadas 44 amostras correspondentes a 19 populações de *H. malabaricus*. A técnica de SSCP mostrou-se fidedigna para inferir a variabilidade dos haplótipos de ATPase. Desta forma, indivíduos com mesmo padrão SSCP (Figura 9), mas provenientes de diferentes locais, apresentaram seqüências iguais ou pouco divergentes.

Foram alinhados 676 pares de bases correspondentes ao segmento 8149 - 8835 do genoma mitocondrial de *Eigenmannia* sp. (acesso NCBI, AB054131), sendo 180 caracteres variáveis e 146 informativos para parcimônia. As árvores de máxima parcimônia apresentaram, a mesma topologia geral quando geradas com pesos para a primeira posição do códon e pesos diferenciais para transversões vs. transições. As variações ocorreram em relação aos valores de bootstrap e à topologia dos haplótipos do rio Uruguai, os quais aparecem como não resolvidos quando a análise inclui pesos para a primeira posição do códon. A árvore de MP foi escolhida com base nos maiores valores de bootstrap, obtida com peso 2 na primeira posição (Figura 10).

Na análise de máxima verossimilhança, o modelo HKY85 + G (Hasegawa, Kishino e Yano 1985) apresentou o melhor ajuste aos dados de ATPase ($P < 0.01$), com distribuição gama e parâmetro $\alpha=0$. Este modelo leva em conta a relação entre transversões e transições, além de considerar distorções na distribuição das bases nitrogenadas. A composição de bases foi ligeiramente maior para A e T ($A+T= 56,96\%$) com valores médios de: $A= 0,2947$, $C= 0,2985$, $G= 0,1319$ e $T= 0,2749$. A árvore de ML apresentada na figura 11 não corresponde à árvore consenso, apresentando-se melhor resolvida, mas com baixos valores de bootstrap separando alguns grupos não resolvidos com MP. Os haplótipos analisados foram divididos em seis clados (geograficamente dispostos na figura 12) com alto suporte estatístico (bootstrap próximo de 100% para MP e ML), embora a topologia básica das árvores não tenha sido resolvida (Figuras 10 e 11).

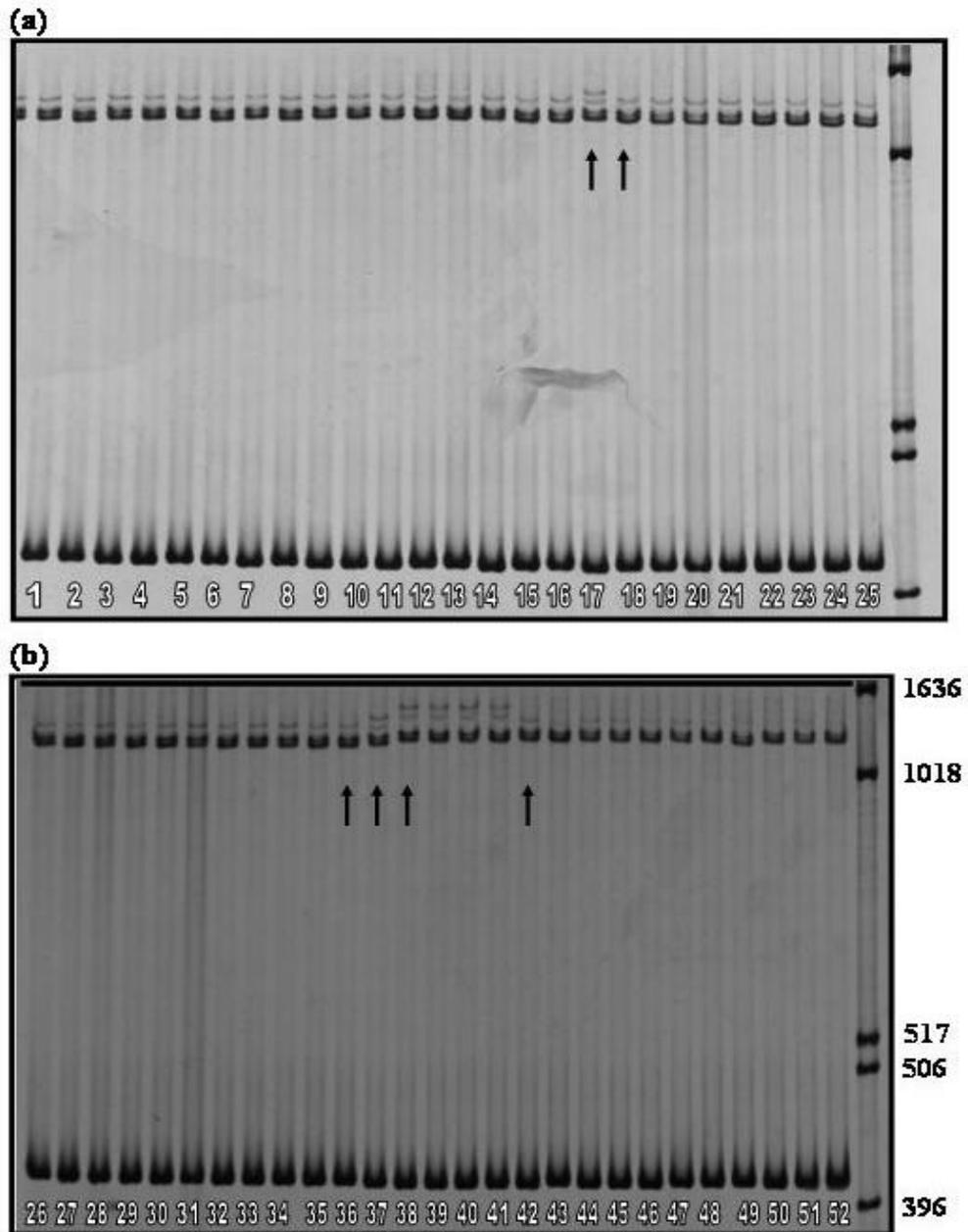


Fig. 9. Géis da poliacrilamida evidenciando os padrões de fita simples para amostras das bacias dos rios de Contas (1-10), Pardo (11-14), Jequitinhonha (15-32), Buranhém (33-37), Jucuruçu (38-39), Itanhém (40-41), Mucuri (42-44) e São Mateus (45-52). Observe que o padrão fita simples para as amostras do rio Jequitinhonha são semelhantes entre si e ao rio Buranhém. As amostras 17 e 37 equivalem aos haplótipos JQ 03 e BU 03, respectivamente, semelhantes entre si e divergentes dos demais componentes destas bacias.

O primeiro grupo, que será tratado aqui como clado São Francisco (SF), compõe-se de populações das bacias dos rios São Francisco, Paraguaçu, Contas, Pardo, Jequitinhonha e Buranhém. O segundo grupo, Sudeste (SE) é formado pelas populações dos rios Jucuruçu, Mucuri, São Mateus e Doce. O clado SE é limitado ao sul pela Serra do Caparaó, ao norte pela Serra da Canabrava e ao oeste pelo sistema do Espinhaço, separando os tributários do São Francisco das bacias costeiras. O terceiro clado é o Rio de Janeiro (RJ) e apresenta uma distribuição geográfica mais restrita, sendo composto por populações dos rios Itabapoana, Paraíba do Sul, Macaé e São João. O clado RJ estende-se até a Serra dos Órgãos que separa o rio Paraíba de pequenos sistemas que compõem o quarto grupo, o clado Sul (SL). Este, por sua vez, é representado por traças da cachoeira de Macacu (drenagem da baía da Guanabara), do rio Ribeira de Iguape e do córrego Perequê (estado do Paraná), incluindo também espécimes do rio Canoas, na porção superior da bacia do rio Uruguai. Mais ao sul, o clado Uruguai (UR) apresentou amostras apenas da bacia do rio Uruguai, com indivíduos de Tacuarembó e Durazno (Uruguai). O último clado, Aguapey (AG), também se apresenta restrito à bacia do rio Uruguai e foi composto por populações dos rios Aguapey (Argentina), rio Uruguai (localidade de Uruguaiana) e rio Santa Maria (Rosário do Sul) (Figura 12).

As divergências entre as seqüências internas aos clados apresentaram-se, geralmente, pequenas. Uma exceção para este padrão é apresentada para os haplótipos JQ 03 e BU 03, que divergem em apenas 0,4% entre si, mas chegam a 3,1% entre JQ 03 e um haplótipo do rio Pardo (PD 01). O haplótipo PS 02 também apresenta uma grande divergência para os demais haplótipos de seu clado, variando de 1,3 % a 1,9%, enquanto os demais haplótipos de RJ se diferenciam em até 0,9% (ver anexo 03). A tabela 4 apresenta a divergência média entre os clados e o tempo estimado de divergência entre estes.

O haplótipo uUR 01 apresentou 10,9%, 10,7% e 7,4% de divergência para os espécimes de Aguapey, Santa Maria e Tacuarembó, respectivamente. Já as diferenças entre haplótipos dos clados UR e AG variaram entre 8,6% e 9,5%, indicando que há pelo menos três grupos coexistindo na bacia do rio Uruguai.

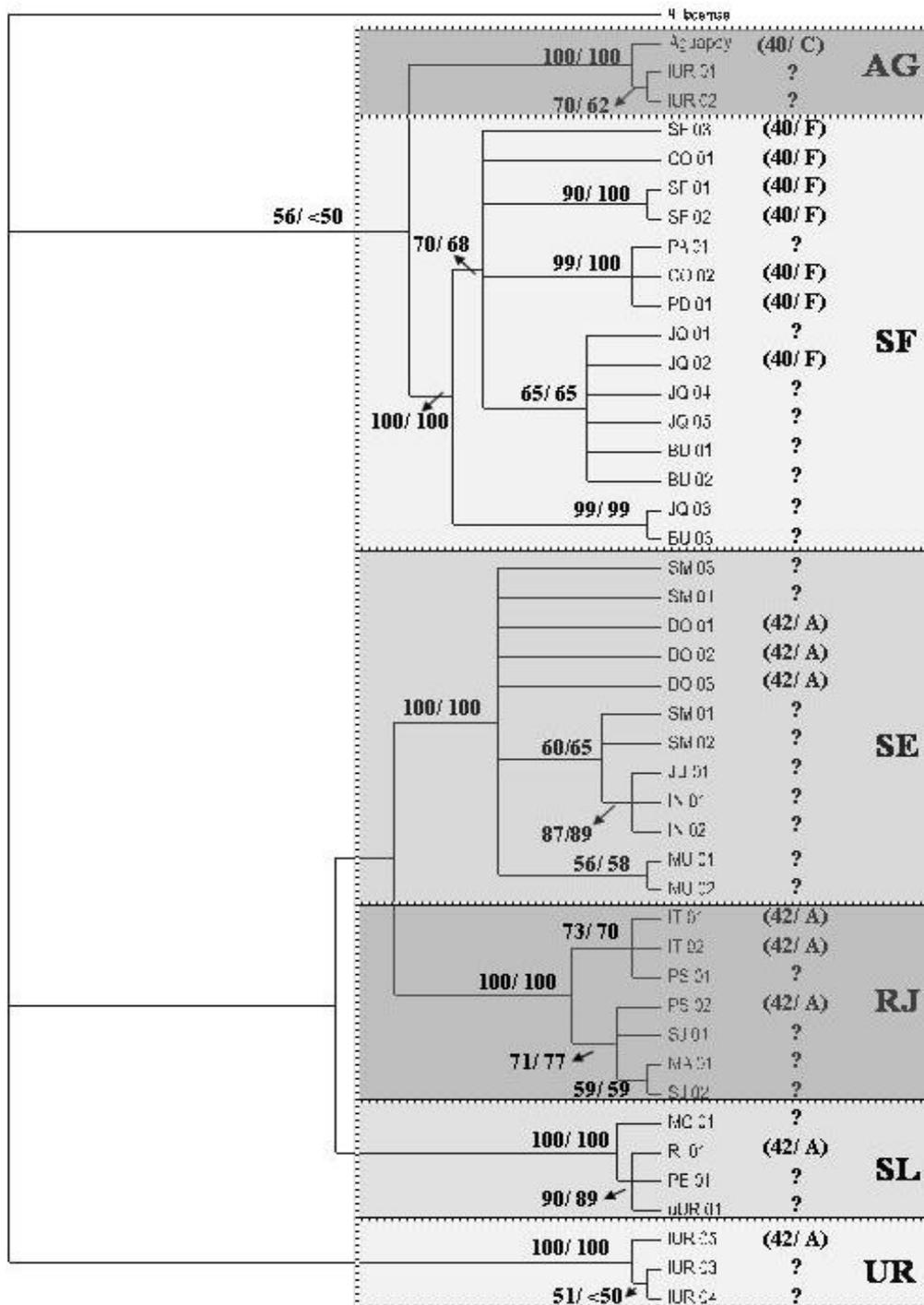


Fig. 10. Árvore de Máxima Parcimônia para haplótipos de ATPase de *Hoplias malabaricus*, obtida com uso de peso 2 para primeira posição de cada códon. As letras em negrito indicam os seis clados suportados pela análise. Os números próximos aos ramos indicam valores de bootstrap acima de 50%. Entre parênteses estão indicados o número diplóide e citótipo dos exemplares cariotipados.

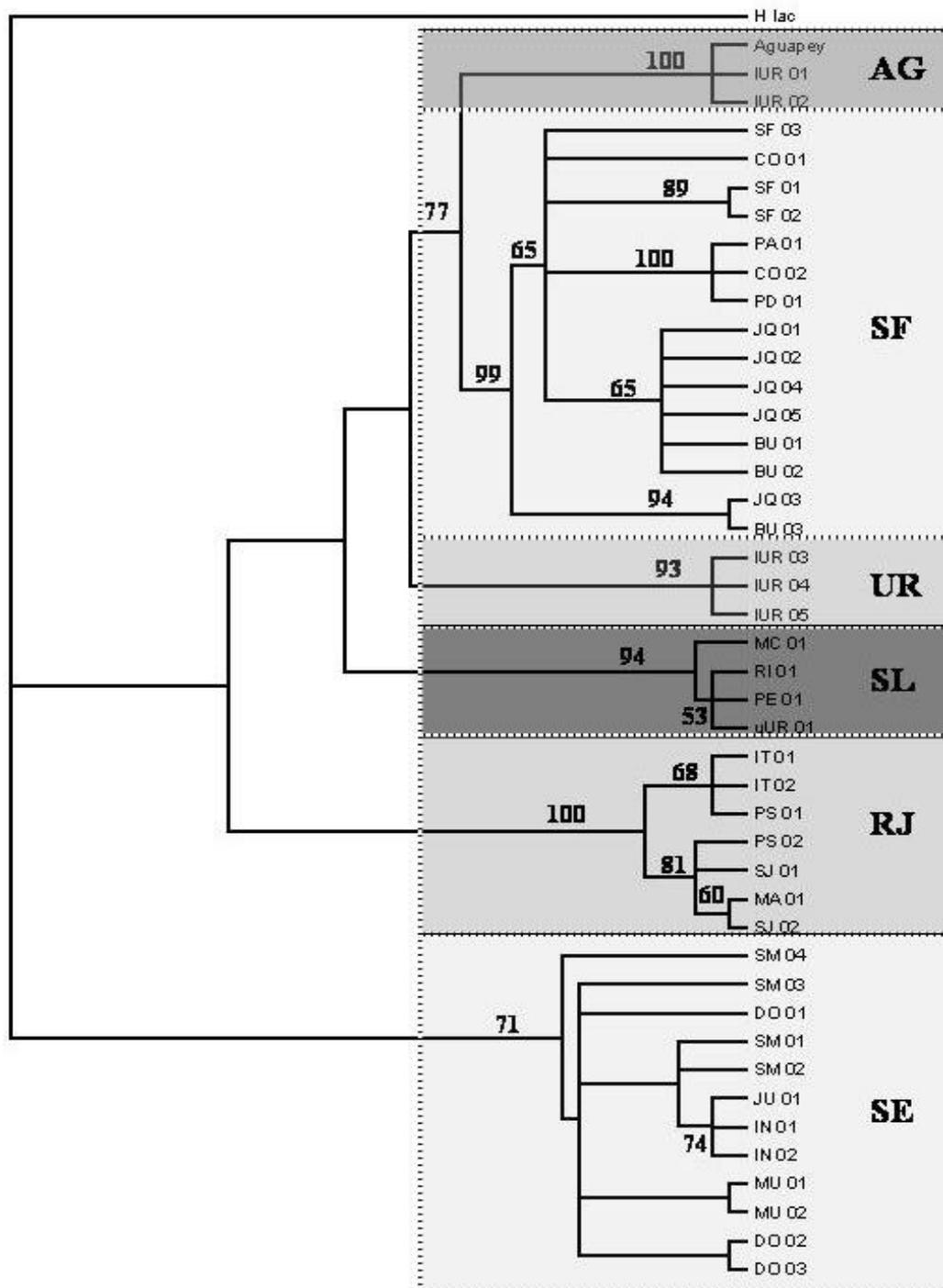


Fig. 11. Árvore de Máxima Verossimilhança para haplótipos de ATPase de *Hoplias malabaricus*, obtida pelo modelo HKY + G. As letras em negrito indicam os seis clados suportados pela análise. Os números próximos aos ramos indicam valores de bootstrap acima de 50%.

Tabela 4. Divergência média entre haplótipos dos clados de *H. malabaricus* (em percentuais). Entre parêntesis, intervalo de tempo de divergência em milhões de anos, estimado a partir do relógio molecular calibrado por Sivasundar *et al.* (2001) para o gene ATPase.

	SF	SE	RJ	SL	UR
SE	8,09 (7,1-8,3)				
RJ	10,37 (9,2-10,6)	6,25 (5,2-6,7)			
SL	9,64 (8,6-10)	7,86 (6,9-8)	8,45 (7,7-8,1)		
UR	8,91 (8-9,2)	8,72 (7,8-8,6)	9,59 (8,7-9,2)	7,44 (6,7-7,2)	
AG	8,11 (6,9-8)	8,90 (8,1-8,6)	10,89 (9,5-10,4)	10,73 (9,9-10,3)	8,88 (8,0-8,7)

DISCUSSÃO

Os dados de seqüências de mtDNA permitiram a separação das populações costeiras em seis clados, de forma congruente com os dados cariotípicos conhecidos para o complexo *H. malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000), representando porém, uma maior resolução dentro destes dados cariotípicos. Desta forma, os clados SE, RJ, SL e UR apresentam os citótipos costeiros 2n=42 subtipos A e B (segundo Bertollo *et al.*, 2000). Os clados SF e AG são formados por populações com 2n=40 representando o citótipo F e citótipo C respectivamente (Figura 10). Este último apresentou-se no grupo basal em uma recente filogenia proposta para o gene mitocondrial citocromo b, com populações de traíras das grandes bacias do país (Dergam, 1996). Sua topologia próxima ao clado SF sugere que o sinal filogenético para fragmento de ATPase 6-8 ainda recupera estes haplótipos como aparentados, com valores de bootstrap maiores que 50%.

Segundo os cladogramas das figuras 10 e 11, a bacia do rio Uruguai apresenta uma ampla diversidade genética do complexo *H. malabaricus*. A presença de haplótipos semelhantes ao do rio Aguapey sugere que citótipos com 40 cromossomos não estão restritos ao rio Aguapey, como sugerido em outros estudos (Dergam, 1996; Lopes *et al.*, 1998). Dada a proximidade de seqüências mitocondriais, provavelmente as populações fazem parte do grupo C e sua ampla ocorrência na bacia sugere sua presença anterior à separação Paraná-Uruguai, no Mioceno (Beurlen, 1970). Além disso, estes resultados sugerem que na bacia do rio Uruguai coexistem dois clados distintos com 42 cromossomos. A presença do haplótipo uUR01, semelhante aos rios Ribeira e Perequê (0,1% de divergência), além do Alto Iguaçu e Tibagi (Dergam 1996), sugerem uma ligação recente entre drenagens destas bacias ou ainda, um efeito antrópico de introdução. Dados moleculares da população de traíras do rio Iguaçu indicam um alto grau de semelhança entre esta população e as bacias costeiras de Paranaguá e Ribeira e estudos cariotípicos indicam a ocorrência dos citótipos 2n= 42 A e B no Iguaçu (Lemos *et al.*, 2002). A hipótese de ligação entre as bacias se justifica pela grande proximidade de drenagens que alimentam a bacia do Uruguai e outros rios costeiros, separadas pela Serra da Anta Gorda e Aparados da Serra. Hipóteses sobre dispersão de haplótipos poderão ser testadas futuramente com

uma análise mais abrangente de populações da bacia do rio Uruguai, baixo Paraná e outras drenagens relacionadas.

Padrões de distribuição de peixes de água doce

A topologia pouco resolvida entre os clados de *H. malabaricus* restringe o poder de comparação entre a distribuição desta espécie e outros táxons. A alopatria entre populações ao norte e ao sul do banco de Abrolhos é corroborada pela distribuição de várias espécies de peixes de água doce (capítulo 1), mas a separação dos clados SE, RJ e SL como pertencentes a regiões biogeográficas discretas diverge em relação à distribuição de muitas espécies (Anexo 2).

A despeito dos problemas apresentados, o padrão biogeográfico sugerido para costa leste do Brasil, a partir da seqüência do fragmento ATPase 6-8, é corroborado pela distribuição de várias espécies de peixes de água doce. *Moenkhausia doceana*, *Pogonopoma wertheimeri* e *Pachyurus adpersus* são algumas das poucas espécies citadas estritamente para a região de distribuição do clado SE. Já *Hyphessobrycon duragenis*, *Ituglanis parahybae* e *Trichomycterus immaculatus*, dentre outras, apresentam distribuição concordante com aquela apresentada pelo clado RJ. Os gêneros *Spintherobolus* e *Listrura* apresentam-se restritos a região de distribuição do clado SL, com exceção de *S. papilliferus* que ocorre em cabeceiras da bacia do rio Tietê (drenagem do Paraná). Na verdade, um grande número de espécies são restritas à região de distribuição de SL, o que pode ser justificado pelo grande conhecimento sobre a ictiofauna desta região quando comparado às outras drenagens.

Espécies como *Prochilodus lineatus*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Corydoras nattereri* e *Geophagus brasiliensis* estão distribuídas desde SE até SL. Outras espécies ocorrem em duas dentre as três áreas que subdividem as traíras na costa leste: *Prochilodus vimboides*, *Leporinus conirostris* e *Microcambeva barbata* ocorrem nas áreas de distribuição dos clados LE e RJ, enquanto *Characidium interruptum* e *Gymnotus sylvius* são algumas das poucas espécies restritas a RJ e SL. Dados mitocondriais corroboram a menor divergência encontrada entre SE e RJ, podendo-se inferir que as barreiras à transposição da ictiofauna entre RJ e SL são mais antigas, ou mais eficientes para um maior número de espécies, que aquelas entre SE e RJ.

Bizerril (1994) propõe a existência de duas subunidades biogeográficas na costa leste a partir de padrões de endemismo de peixes. A primeira área corresponde a área de distribuição dos clados SF, SE e RJ, enquanto a segunda área é correspondente a distribuição de SL. Já Menezes (1988) propõe duas sub-regiões de endemismo para o gênero *Oligosarcus*, corroborada pela distribuição de *Mimagoniates* spp. (Weitzman *et al.*, 1988), a primeira equivalente à distribuição de SE e a outra equivalente à distribuição de RJ e SL.

Questões ecológicas intrínsecas a cada espécie, ou grupo de espécies, podem estar relacionadas à transposição de barreiras entre SE, RJ e SL. Neste contexto, *Hoplias malabaricus* apresenta-se como um ótimo modelo para estudos filogeográficos, sendo uma espécie de hábitos sedentários e ampla ocorrência no continente.

Relógio Molecular

Considerando a grande variância de estimativas de relógio molecular, utilizou-se a calibragem de seqüências conforme proposta para a ATPase para espécies do gênero *Prochilodus* (Sivasundar *et al.*, 2001). Com base na idade de separação do Paleó-Amazonas-Orinoco da bacia do rio Magdalena (~10 M.a., Lundberg *et al.*, 1998), estes autores propuseram uma taxa de divergência de 0,54% por M.a.

A divergência entre haplótipos dentro de cada clado foi, em geral, inferior a 2%, sugerindo uma diferenciação recente dos haplótipos, ocorrido durante o Pleistoceno (inferior a 1,8 M.a.). Padrões de distribuição relacionados a idades geológicas recentes também têm sido sugeridos por Beheregaray *et al.*, (2002) para o peixe-rei *Odonthestes* e por Weitzman *et al.* (1988) para o gênero *Mimagoniates*.

Porém, processos geomorfológicos mais antigos seriam necessários para explicar o grau de diversidade de haplótipos no clado SF. Este clado apresenta pelo menos dois clados menores internos, sendo um agrupamento basal formado pelos haplótipos JQ 03 e BU 03, e outro grupo composto pelos demais haplótipos (Figuras 10 e 11), com divergência entre haplótipos de 2,1 milhões de anos. Dados geomorfológicos sugerem que, no Mioceno, o rio Jequitinhonha deveria continuar seu curso através do rio Verde Grande, um afluente do São Francisco. O soergimento da Serra do Espinhaço, juntamente com a formação do Gráben de Virgem da Lapa e a inclinação progressiva do eixo da bacia direcionaram a captura do

São Francisco para uma drenagem Atlântica durante o Plioceno, resultando no curso atual do rio Jequitinhonha (Campos, 1998). Tais dados são congruentes com a separação estimada para os clados de SF, sugerindo que os haplótipos JQ 03 e BU 03 sejam derivados de uma população originalmente presente na bacia do rio São Francisco e isoladas pelos eventos acima citados. A simpatria entre os grupos presentes no rio Jequitinhonha deve ter ocorrido com a dispersão dos haplótipos derivados em algum período glacial recente, assim como a dispersão do haplótipo basal para o rio Buranhém, sendo a coalescência entre JQ 03 e BU 03 estimada para 370 mil anos. A posição basal para haplótipos dos rios Jequitinhonha e Buranhém pode ser um efeito de amostragem da bacia do São Francisco, dado que os haplótipos disponíveis desta bacia estão restritos ao alto São Francisco (Curvello- Estado de Minas Gerais).

O pequeno grau de divergência entre os haplótipos dos rios Macacu, Ribeira de Iguape e Paranaguá sugere que uma regressão marinha possibilitou a dispersão de traíras através de paleocanais que ligavam um grande número de pequenas drenagens na costa sul durante o Quaternário. Os rios Ribeira e Perequê (0,1 M.a) devem ter participado da formação de um Paleo rio, próximo a baía de Paranaguá, como sugerido por Amador (1997) para o Paleo Rio Guanabara, formado pelas drenagens da Guanabara, incluindo aí o rio Macacu. A estreita identidade entre o haplótipo de rio Ribeira e o rio Canoas (bacia do rio Uruguai) pode ser resultado de intervenção antrópica nestas bacias, ou ainda, devido a eventos de dispersão desconhecidos, envolvendo a bacia do rio Iguassu, onde um haplótipo é estreitamente aparentado com os peixes do rio Ribeira (Dergam, 1996).

Além do conjunto de Serras já relatado, o clado SF é separado dos demais grupos costeiros por feições paleolitorâneas na margem leste brasileira, entre 17° e 20° S. Esta formação corresponde ao Banco Abrolhos, onde o soerguimento da plataforma continental juntamente as condições de aridez em períodos glaciais devem explicar a alopatría entre SF e SE (capítulo 1). A possível origem do clado SF a partir de populações amazônicas, inferido pela divergência entre SF e AG (Tabela 4), não é, em princípio, congruente com uma origem de linhagens de haplótipos (ou mesmo de citótipos) que ocorreu posteriormente à separação Paleo Amazonas – Orinoco do sistema Paraná (11,8- 10 M.a.) (Lundberg *et al.*, 1998). Esta incongruência pode indicar, alternativamente, que a calibração de relógio molecular proposta para *Prochilodus* é muito lenta para as traíras.

A variação genética entre os clados SE, RJ e SL (8,1- 5,6 M.a.), com estimativas de separação para o Mioceno superior, sugere que variações marinhas do quaternário seriam muito recentes para explicar esta divergência. A dispersão pleistocênica verificada entre populações de um mesmo clado deve ser inferida por paleodrenagens compostas por bacias contemporâneas que se juntariam durante eventos de regressão marinha. Feições topográficas no banco Abrolhos corroboram a paleodrenagem para rios adjacentes a este (Figura 6, capítulo 1), da mesma forma como deve ter funcionado como barreira à dispersão de populações entre as bacias dos grupos SE e RJ.

Segundo Melo (2000) a distribuição da ictiofauna encontrada entre as regiões RJ e SL deriva, basicamente, de eventos glaciais recentes. Esta hipótese não parece aplicável para *H. malabaricus* cuja estimativa de divergência entre os haplótipos dos clados RJ e SL é de cerca de 7,8 M.a.

Outro ponto importante de vicariância entre as populações estudadas é a separação das bacias do rio Uruguai e Alto Paraná (24-5 M.a.) (Beurlen, 1970). Segundo dados de ATPase em *H. malabaricus*, os clados AG e UR estão separados a cerca de 8,2 M.a, o qual se aproxima do indicado por Montoya-Burgos (2003) para espécies do gênero *Hypostomus*, presentes nas bacias supracitadas, a cerca de 9,3 milhões de anos.

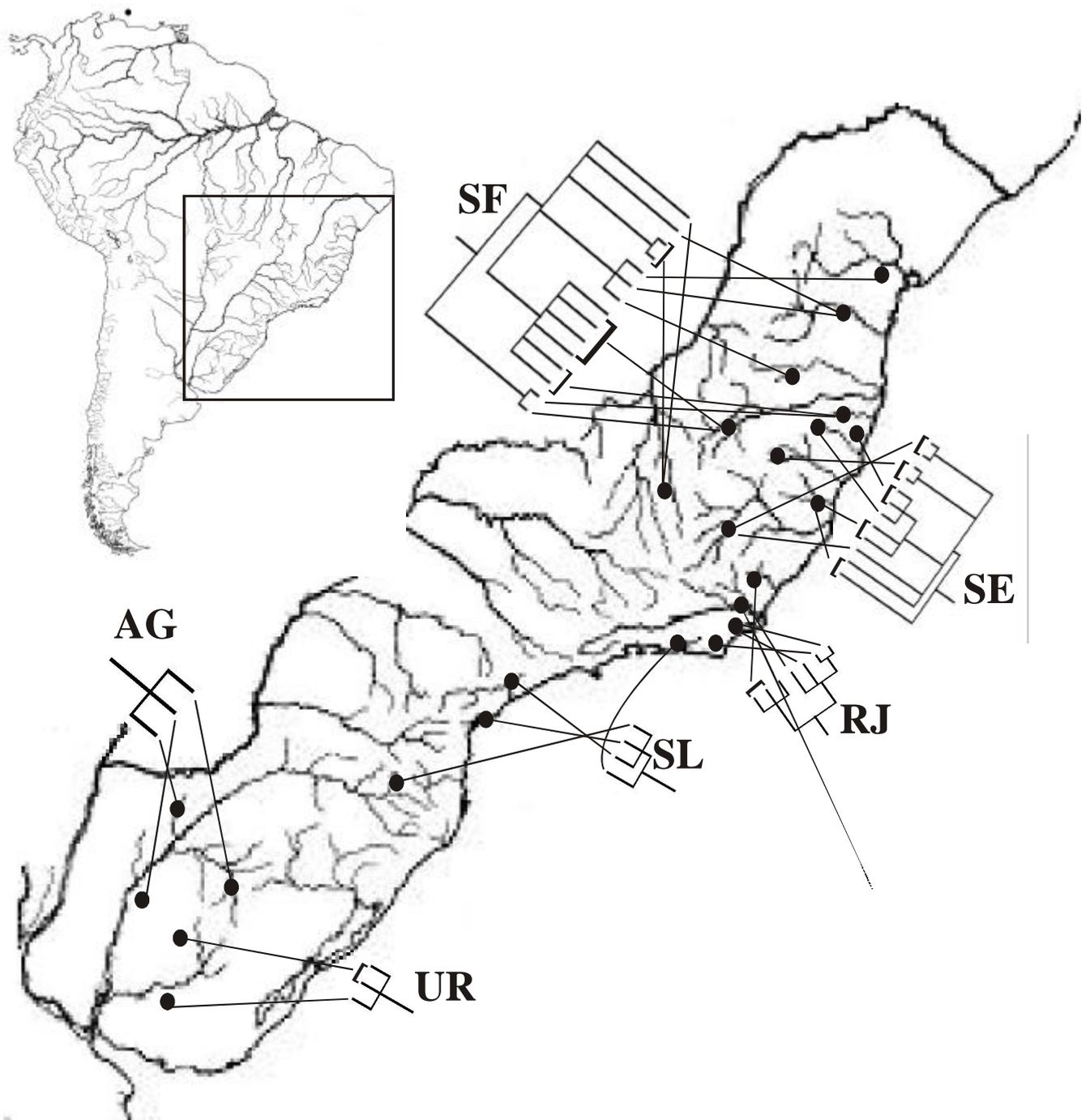


Fig. 12. Padrão de distribuição dos seis clados de *Hoplias malabaricus* segundo filogenia apresentada pelo fragmento ATPase 6-8: SF= clado São Francisco, SE= Sudeste, RJ= Rio de Janeiro, SL= Sul, UR= Uruguai e AG= Aguapey.

CONCLUSÃO

Populações costeiras de *Hoplias malabaricus* apresentam quatro padrões distintos de seqüências de mtDNA. Já a bacia do rio Uruguai apresenta três diferentes padrões haplotípicos, sendo um equivalente ao clado costeiro SL.

A separação do clado costeiro SF é corroborada por padrões RAPD, citogenéticos e pela distribuição de espécies de peixes nas bacias costeiras, reforçando a influência do Banco Abrolhos na distribuição da ictiofauna da costa leste do Brasil.

Os padrões geomorfológicos que delimitem a distribuição dos clados SE, RJ e SL são pouco conhecidos. A baixa concordância entre estes clados e a distribuição de peixes entre as bacias costeiras sugere que fatores ecológicos intrínsecos às diferentes espécies devam estar relacionadas à dispersão de populações entre as áreas de distribuição destes clados.

As populações costeiras diferem das populações das bacias continentais por serem alopátricas (exceto as traíras do rio Uruguai). Isto sugere que a história da ocorrência das traíras ocorreu em nível de bacias próximas associadas, com extenso contato com bacias continentais, como foi o caso do clado SF e possivelmente do clado SE.

Estimativas baseadas em taxas de mutação sugerem uma diferenciação miocênica entre os clados costeiros, enquanto eventos pleistocênicos explicariam as diferenças observadas dentro de cada clado.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Allendorf, F.W. & L.W. Seeb. 2000. Concordance of genetic divergence among sockeye salmon populations at allozyme, nuclear DNA and mitochondrial DNA markers. **Evolution**, **54**: 640-651.
- Avise, J.C. 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. **Oikos**, **63**: 62-76.
- Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: A personal reflection. **Molecular Ecology**, **7**: 371-379.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb & N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **18**: 489-522.
- Avise, J.C. 2000. **Phylogeography. The History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 447.
- Beheregaray, L.B., P. Sunnucks. & D.A. Briscoe. 2002. A rapid fish radiation associated with the last sealevel changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. **Proceeding of the Royal Society of London B**, **269**: 65-73.
- Bermingham, E. & J.C. Avise. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. **Genetics**, **113**: 939-965.
- Bermingham, E. & A.P. Martin. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Molecular Ecology**, **7**: 499-517.
- Bermingham, E. & C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. **Molecular Ecology** **7**: 367-369.

- Bertollo, L.A.C., C.S. Takahashi & O. Moreira-Filho. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, **1** (2): 103-120.
- Bertollo, L.A.C., C.S. Takahashi & O. Moreira-Filho. 1979. Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, **2** (1): 17-37.
- Bertollo, L.A.C., C.S. Takahashi & O. Moreira-Filho. 1983. Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). **Cytologia**, **48**: 1-12.
- Bertollo, L.A.C., G.G. Born, J.A. Dergam, A.S. Fenocchio & O. Moreira-Filho. 2000. A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, **8**: 603-613.
- Beurlen, K. (1970). **Geologie Von Brasilien**. Gebrüder Borntraeger, Berlin. Stuttgart. 444p.
- Bielawski, J.P. & D.E. Pumo. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. **Heredity**, **78**: 32-40.
- Bizerril, C.R.S.F. 1994. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste do Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, **16** (1): 51-80.
- Black IV, W. C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. **Insect Molecular Biology**, **2**: 1-6.
- Born, G.G. & L.A.C. Bertollo. 2001. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with $2n= 42$ chromosomes. **Genetica**, **110**: 1-9.
- Boyce, T. M., M. E. Zwick, & C. F. Aquadro. 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. **Genetics**, **123**:825-836.
- Callejas, C. & M.D. Ochando. 2002. Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers. **Heredity**, **89**: 36-43.
- Campos, J.C.F. 1998. **Solos, geomorfologia e evolução da paisagem no alto e médio Jequitinhonha, Minas Gerais**. Unpublished M.S. Dissertation, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 207p.

- Castro, R.M.C. 1990. **Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes)**. Unpublished D.S. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 293p.
- Castro, R.M.C. & R.P. Vari. 2003. Family Prochilodontidae. Pp. 65-70. In: Reis, R.E., S.O. Kullander. & C.J. Ferraris Jr. (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South America**. Edipucrs, Porto Alegre.
- Costa, 1974. Cor de sedimentos superficiais da plataforma continental Brasileira. Pp. 237-261. In: **Anais da Sociedade Brasileira de Geologia V.3., Congresso Brasileiro de Geologia, 28**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- Dergam, J.A. 1996. **Phylogeography and character congruence within the *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysi)**. Unpublished Ph.D. Dissertation, Colorado State University, Fort Collins, Colorado. 108p.
- Dergam, J.A. & L.A.C. Bertollo. 1990. Karyotypic diversification in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) of the São Francisco and Alto Paraná basins, Brazil. **Brazilian Journal of Genetics, 13**: 755-766.
- Dergam, J.A., S.R. Paiva, C.E. Shaeffer, A.L. Godinho & F. Vieira. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology, 25** (4): 379-387.
- Dergam, J.A., H.I. Suzuki, O.A. Shibatta, L.F. Duboc, H.F. Júlio Jr., L. Giuliano-Caetano & W.C. Black IV. 1998. Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçú, Tibagi, and Paraná rivers. **Genetics and Molecular Biology, 21**: 493-496.
- Efron, B. 1985. Bootstrap confidence intervals for a class of parametric problems. **Biometrika, 72**:45-58.
- Eler, E.S., J.A. Dergam, L.C. Paiva, G.A.S. Miranda & A.A. Oliveira. 2004. Filogeografia cromossômica nas bacias do Leste e o cariótipo de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) do rio Pardo, MG. **CD de Resumos do Congresso Brasileiro de Genética**. Florianópolis, Santa Catarina.
- Ferreira, R.H.R., C.G. Fonseca, L.A.C. Bertollo & F. Foresti. 1989. Cytogenetics of fishes from Parque Estadual do Rio Doce (MG). I. Preliminary study of “*Hoplias malabaricus*” (Pisces, Erythrinidae) from Lagoa Carioca and Lagoa dos Patos. **Brazilian Journal of Genetics, 12**: 219-226.

- Fritsch, P. & L.H. Rieseberg. 1996. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. Pp. 54-73. In: Smith, T.B. & R.K. Wayne. **Molecular Genetics Approaches in Conservation**. Oxford Press University, New York.
- Garavello, J.C. 1979. **Revisão taxonômica do gênero Leporinus Spix, 1829 (Ostariophysi, Anostomidae)**. Unpublished D.S. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo.451p.
- Guazelli, W. & J.C. Carvalho. 1981. Estruturas da margem continental leste brasileira e das áreas oceânicas e continentais adjacentes. Pp. 117-143. In: Mello, L.A.M. (ed.) **Estruturas e Tectonismo da Margem Continental Brasileira, e suas Implicações nos Processos Sedimentares e na Avaliação do Potencial de Recursos Minerais**. Série Projeto Remac N° 9. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento, PETROBRÁS.
- Haffer, J. 1982. General aspects of the refuge theory. Pp. 6-24. In: Prance, G.T. **Diversification in the Tropics**. Columbia University Press, New York.
- Hasegawa, M., H. Kishino & T. Yano. 1985. Dating of the humam-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, **22**: 160-174.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP.: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **PCR Methodology and Application**, **1**: 34-38.
- Haymer, D.S. 1994. Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: what are they, and can they tell us anything that we don't really know? **Annual Entomological Society of America**, **87**: 717-722.
- Hillis, D.M., B.K. Mable & C. Moritz.1996.Applications of the molecular systematics: the state of the field and a look to the future. Pp. 515-543. In: Hillis, D.M., C. Moritz & B.K. Mable. **Molecular Systematics, Second Edition**. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Hiss, R.H., D.E. Norris, C.R. Dietrich, R.F. Whitcomb, D.F. West, C.F. Bosio, S. Kambhampati, J. Peisman, M.F. Antolin & W.C. Black IV. 1994. Molecular taxonomy using single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of mitochondrial DNA genes. **Insect Molecular Biology**, **2**: 171-182.
- Kowsmann, R.O. & M.P.A. Costa. 1979. Sedimentação Quaternária da Margem Continental Brasileira e das Áreas Oceânicas Adjacentes. Série Projeto Remac N° 8. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento, PETROBRÁS.

- Kumar, S., K. Tamura & M. Nei. 2004. Mega 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, **5**: 150-163.
- Lemos, P.M.M., A.S. Fenocchio, L.A.C. Bertollo & M.M. Cestari. 2002. Karyotypic on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau of the Iguaçú river basin (Paraná state, Brazil). **Caryologia**, **55** (3): 193-198.
- Lopes, P.A. & A.S. Fenocchio. 1994. Confirmation of two different cytotypes for the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* Gill 1903 (Characiformes). **Cytobios**, **80**: 217-221.
- Lopes, P.A.; A.J. Alberdi, J.A. Dergam & A.S. Fenocchio. 1998. Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in the Aguapey river (Province of Corrientes, Argentina). **Copeia** **1998**: 485-487.
- Lundberg, J.G. 1998. The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. Pp.50-68. In: Malabarba, L.R., R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena (eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Lundberg, J.G., L.G. Marshall, J. Guerrero, B. Horton, M.C.S.L. Malabarba & F. Wesselingh. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South America rivers. Pp.13-48. In: Malabarba, L.R., R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena (eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Mamuris, Z., C. Stamatis, M. Bani & C. Triantaphyllidis. 1999. Taxonomic relationships between four species of the Mullidae family revealed by three genetic methods: allozymes, random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA. **Journal of Fish Biology**, **55**: 572-587.
- Martim, A.P. & E. Bermingham. 2000. Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical catfish. **Proceedings of the Royal Society of London** **267**: 1135-1141.
- Meffe, G. K. & C.R. Carroll. 1994. **Principles of conservation biology**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Melo, F.A.G. 2000. **A Serra dos Órgãos como barreira biogeográfica para peixes dos gêneros Astyanax Baird e Girard (1854) e Deuterodon Eigenmann (1907) (Teleostei: Characiformes: Characidae)**. Unpublished M.S. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 139.

- Menezes, N.A. 1972. Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das principais bacias fluviais do Brasil. Pp 73-78. In: **Poluição e Piscicultura, notas sobre poluição, ictiologia e piscicultura. Comissão Estadual Bacia Paraná-Uruguaí. Faculdade de Saúde Pública da USP.** Instituto de Pesca. São Paulo.
- Menezes, N.A. 1987. Três espécies novas de *Oligosarcus* Günther, 1864 e redefinição taxonômica das demais espécies do gênero (Osteichthyes, Teleostei, Characidae). **Boletim Zoológico, 11:** 1-39.
- Menezes, N.A. 1988. Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America. Pp. 295-304. In: Vanzolini, P.E. & W.R. Heyer (Eds.). **Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns.** Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetics analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. <http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>
- Mizusaki, A.M., D.B. Alves & J.C.J. Conceição. 1994. Eventos magmáticos nas bacias do Espírito Santo, Mucuri e Cumuruxatiba. Pp. 566-567. **Boletim de Resumos Expandidos V.1, Congresso Brasileiro de Geologia, 38.** Balneário Camboriú, Santa Catarina.
- 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.
- Moraes, R.C.S., A.S. Medrado, R.S. Xavier, V.C.G. Cayres, P.L.S. Carneiro, A.M. Waldschmidt, J.C. Silva Júnior, G.M. Barreto & U.P. Jacobina. 2005. Estudo cariotípico em *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) na região de Jequié, BA. Pp. 49-50. **Anais do XVI Encontro Brasileiro de Ictiologia,** João Pessoa, Paraíba.
- Moreira-Filho, O. 2005. A transposição do rio Piumhi: Um exemplo de mistura de ictiofaunas. Pp. 46. **Anais do XVI Encontro Brasileiro de Ictiologia,** João Pessoa, Paraíba.
- Moyer, G.R., B.M. Burr & C. Krajewski. 2004. Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data. **Zoological Journal of the Linnean Society, 140:** 551-575.
- Mullis, J.C. & F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology, 155:** 335-350.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. **American Naturalist, 106:** 283-292.

- Nelson, G. & N. I. Platnick. 1981. **Systematics and biogeography: cladistics and vicariance**. Columbia University Press, New York.
- Orita M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi & T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. **Proceedings National Academy of Science USA**, **86**: 2766-2770.
- Oyakawa, O.T. 1990. **Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo *lacerdae*) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil (Teleostei: Erythrinidae)**. Unpublished, M.Sc. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 114p.
- Oyakawa, O.T. 2003. Family Erythrinidae. Pp 238-240. In: Reis, R.E., S.O. Kullander. & C.J. Ferraris Jr. (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South America**. Edipucrs, Porto Alegre.
- Page, R.D.M. 1996. Temporal congruence revisited: comparison of mitochondrial DNA sequence divergence in cospeciating pocket gophers and their chewing lice. **Systematic Biology**, **45**: 151-167.
- Perdices, A., E. Bermingham, A. Montilla & I. Doadrio. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **25**: 172-189.
- Pérez, T., J. Albornoz & A. Domínguez. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, **7**: 1347-1357.
- Posada, D. & K.A. Crandall. 1998. ModelTest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, **14**: 817-818.
- Reis, R.E., S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr. 2003. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, 729p.
- Scavone, M.D.P., L.A.C. Bertollo & M.M. Cavallini. 1994. Sympatric occurrence of two karyotypic forms of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Cytobios**, **80**: 223-227.
- Schaefer, S.A. 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). Pp. 375-400. In: Malabarba, L.R., R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena (eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil.

- Shimabukuro-Dias, C.K., C. Oliveira, R.E. Reis & F. Foresti. 2004. Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **32**: 152-163.
- Sivasundar, A., E. Bermingham & G. Ortí. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, **10**: 407-417.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Vari, R. P. 1988. The Curimatidae, a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. Pp. 343-377. In: Vanzolini, P.E. & W.R. Heyer (Eds.). **Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Vari, R.P. 1991. Systematics of the Neotropical Characiform genus *Steindachnerina* Fowler (Pisces: Ostariophysi). **Smithsonian Contributions to Zoology**, **507**: 1-118.
- Vari, R.P. 1992. Systematics of the Neotropical Characiform genus *Cyphocharax* Fowler (Pisces: Ostariophysi). **Smithsonian Contributions to Zoology**, **529**: 1-137.
- Vari, R.P. & L.R. Malabarba. 1998. Neotropical ichthyology: an overview. Pp 1-11. In: In: Malabarba, L.R., R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena (eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil.
- Vari, R.P. & S.H. Weitzman. 1990. A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America. Pp. 381-393. In: Peters, G. & R. Hutterer (eds.). **Vertebrates in the tropics**. Museum Alexander Koenig, Bonn.
- Vicalvi, M.A., Costa, M.P.A. & R.O. Kowmann. 1978. Depressão de Abrolhos: uma paleolaguna holocênica na plataforma continental leste brasileira. **Boletim Técnico da Petrobrás**, **21** (4): 279-286.
- Vicari, M.R., R.F. Artoni & L.A.C. Bertollo. 2005. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genetics and Molecular Biology**, **28** (1): 103-111.
- Weitzman, S.H., N. A. Menezes. & Weitzman, M. J. 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. Pp. 379-427. In: Vanzolini, P.E. & W.R. Heyer (Eds.). **Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.

Weitzman, S.H. & M. Weitzman. 1982. Biogeography and evolutionary diversification in neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. Pp. 403-422. In: **Biological Diversification in the Tropics**. Prance, T.G. (ed.) Columbia University Press.

Williams, J.K.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalsky & S.V. Tynger. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18**: 6531-6535.

ANEXO 01

Locais de coleta dos espécimes utilizados neste trabalho e respectivos códigos de tombo na coleção de tecidos do Laboratório de Sistemática Molecular da Universidade Federal de Viçosa e da coleção de peixes do Museu de Zoologia João Moojen de Oliveira. As amostras marcadas com asterisco (*) são provenientes de doações, estando apenas o respectivo tecido presente em coleções da Universidade Federal de Viçosa.

Código	Local	Bacia	Município
EE 50*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 51*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 52*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 53*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 54*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 55*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 56*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 57 *	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 58*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 59*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 60*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 61*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 62*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 63*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 64*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 65*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 66 *	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 67 *	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
EE 68*	Represa Pedra do Cavalo	Paraguaçu	Governador Mangabeira/ BA
PC 01	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
PC 02	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
PC 03	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
PC 04	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
PC 05	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
PC 06	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
PC 07	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
PC 08	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
PC 09	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
PC 10	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
PC 11	Rio de Contas	Rio de Contas	Jequié /BA
AA 100	Rio Pardo	Rio Pardo	Taiobeiras/ MG
AA 101	Rio Pardo	Rio Pardo	Taiobeiras/ MG

Código	Local	Bacia	Município
AA 103	Rio Pardo	Rio Pardo	Taiobeiras/ MG
CT 657	Rio Pardo	Rio Pardo	Taiobeiras/ MG
MT 01	Rio Jequitinhonha	Rio Jequitinhonha	Jequitinhonha/ MG
EE 01	Rio Araçuaí	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
EE 02	Rio Araçuaí	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
EE 03	Rio Araçuaí	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
EE 05	Rio Araçuaí	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 01	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 02	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 03	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 04	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 05	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 06	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 07	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 08	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 09	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 10	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 11	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 12	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
AA 13	Rio Calhauzinho	Rio Jequitinhonha	Araçuaí /MG
TP 16	Córrego Jissara	Rio Jequitinhonha	Pedra Azul/ MG
TP 22	Rio Rubim	Rio Jequitinhonha	Rio do Prado/ MG
TP 60	Rio Rubim	Rio Jequitinhonha	Rio do Prado/ MG
JD 698	Rio Buranhém	Rio Buranhém	Eunápolis /BA
JD 699	Rio Buranhém	Rio Buranhém	Eunápolis /BA
JD 701	Rio Buranhém	Rio Buranhém	Eunápolis /BA
JD 705	Rio Buranhém	Rio Buranhém	Eunápolis /BA
JD 706	Rio Buranhém	Rio Buranhém	Eunápolis /BA
JD 668		Rio Buranhém	
JD 674	Rio Jucuruçu	Rio Jucuruçu	Palmópolis /MG
JD 675	Rio Jucuruçu	Rio Jucuruçu	Palmópolis /MG
JD 654	Rio Itanhém	Rio Itanhém	Bertópolis/ MG
JD 655	Rio Itanhém	Rio Itanhém	Bertópolis/ MG
JR 01	Rio Itanhém	Rio Itanhém	Alcobaça /ES
JD 580	Rio Mucuri	Rio Mucuri	Nanuque/ MG
JD 637	Córrego Águas Quentes	Rio Mucuri	Águas Formosas /MG
JD 640	Córrego Águas Quentes	Rio Mucuri	Águas Formosas /MG
JD 465	Rio São Mateus	Rio São Mateus	Barra São Francisco/ ES
JD 525	Rio São Mateus	Rio São Mateus	São Mateus /ES
JD 567	Rio Cotoxé	Rio São Mateus	São Mateus /ES
JD 449	Rio Mantena	Rio São Mateus	Joaquim Flauzino/ ES
JD 506	Rio Muniz	Rio São Mateus	
JD 545	Rio Preto	Rio São Mateus	Guriri /ES
JD 546	Rio Preto	Rio São Mateus	Guriri /ES

Código	Local	Bacia	Município
JD 549	Rio Preto	Rio São Mateus	Guriri /ES
JD 550	Rio Preto	Rio São Mateus	Guriri /ES
JD 551	Rio Preto	Rio São Mateus	Guriri /ES
PF 02	Lago Carioca	Rio Doce	Marliéria /MG
PF 12	Lago Dom Heuvécio	Rio Doce	Marliéria /MG
PF 28	Lago Carioca	Rio Doce	Marliéria /MG
PF 33	Lago Dom Heuvécio	Rio Doce	Marliéria /MG
CT 610	Rio Itabapoana	Rio Itabapoana	Bom Jesus do Itabapoana /RJ
CT 611	Rio Itabapoana	Rio Itabapoana	Bom Jesus do Itabapoana /RJ
CT 612	Rio Itabapoana	Rio Itabapoana	Bom Jesus do Itabapoana /RJ
CT 613	Rio Itabapoana	Rio Itabapoana	Bom Jesus do Itabapoana /RJ
CT 614	Rio Itabapoana	Rio Itabapoana	Bom Jesus do Itabapoana /RJ
CT 615	Rio Itabapoana	Rio Itabapoana	Bom Jesus do Itabapoana /RJ
CT 616	Rio Itabapoana	Rio Itabapoana	Bom Jesus do Itabapoana /RJ
CT 617	Rio Itabapoana	Rio Itabapoana	Bom Jesus do Itabapoana /RJ
JD 1225	Rio Muriaé	Rio Paraíba do Sul	Muriaé/ MG
CT 728	Rio Paraíba do Sul	Rio Paraíba do Sul	Campos /RJ
CT 729	Rio Paraíba do Sul	Rio Paraíba do Sul	Campos /RJ
CT 730	Rio Paraíba do Sul	Rio Paraíba do Sul	Campos /RJ
CT 731	Rio Paraíba do Sul	Rio Paraíba do Sul	Campos /RJ
CT 732	Rio Paraíba do Sul	Rio Paraíba do Sul	Campos /RJ
CT 733	Rio Paraíba do Sul	Rio Paraíba do Sul	Campos /RJ
CT 734	Rio Paraíba do Sul	Rio Paraíba do Sul	Campos /RJ
CT 735	Rio Paraíba do Sul	Rio Paraíba do Sul	Campos /RJ
CT 666	Rio Pomba	Rio Paraíba do Sul	Leopoldina /MG
JD 3872	Rio Macaé	Rio Macaé	Casimiro de Abreu /RJ
JD 3876	Rio Macaé	Rio Macaé	Casimiro de Abreu /RJ
MV 01	Rio do Ouro	Rio São João	Silva Jardim /RJ
MV 03	Rio do Ouro	Rio São João	Silva Jardim /RJ
CT 690	Rio do Ouro	Rio São João	Silva Jardim /RJ
CT 691	Rio São João	Rio São João	Casimiro de Abreu /RJ
JD 3880	Rio São João	Rio São João	Silva Jardim /RJ
JD 3884	Rio São João	Rio São João	Silva Jardim /RJ
MN 04*		Rio Macacu	
MN 05*		Rio Macacu	
IG 01	Rio Ribeira de Iguape	Rio Ribeira de Iguape	Registro /SP
IG 02	Rio Ribeira de Iguape	Rio Ribeira de Iguape	Registro /SP
IG 03	Rio Ribeira de Iguape	Rio Ribeira de Iguape	Registro /SP
OH 01	Rio Perequê	Rio Perequê	Paranaguá /PR
OH 02	Rio Perequê	Rio Perequê	Paranaguá /PR
OH 03	Rio Perequê	Rio Perequê	Paranaguá /PR
73*	Represa Machadinho	Rio Uruguai	
74*	Represa Machadinho	Rio Uruguai	
75*	Represa Machadinho	Rio Uruguai	

Código	Local	Bacia	Município
89*	Represa Machadinho	Rio Uruguai	
91*	Represa Machadinho	Rio Uruguai	
129*	Represa Machadinho	Rio Uruguai	
205*	Represa Machadinho	Rio Uruguai	
208*	Represa Machadinho	Rio Uruguai	
237*	Represa Machadinho	Rio Uruguai	
9501	Lagoa marginal	Rio Uruguai	Uruguaiana /RS
9502	Lagoa marginal	Rio Uruguai	Uruguaiana /RS
9503	Lagoa marginal	Rio Uruguai	Uruguaiana /RS
9507	Rio Santa Maria	Rio Uruguai	Rosário do Sul /RS
9508	Rio Santa Maria	Rio Uruguai	Rosário do Sul /RS
9509	Rio Santa Maria	Rio Uruguai	Rosário do Sul /RS
AN 01	Lagoa Magnólia	Rio Uruguai	Tacuarembó, Uruguai
AN 02	Lagoa Magnólia	Rio Uruguai	Tacuarembó, Uruguai
AN 03	Lagoa Magnólia	Rio Uruguai	Tacuarembó, Uruguai
AN 04	Lagoa Magnólia	Rio Uruguai	Tacuarembó, Uruguai
AN 05	Lagoa Magnólia	Rio Uruguai	Tacuarembó, Uruguai
AN 06	Lagoa Magnólia	Rio Uruguai	Tacuarembó, Uruguai
AN 07	Lagoa Magnólia	Rio Uruguai	Tacuarembó, Uruguai
JD 3862	Córrego Tejera	Rio Uruguai	Durazno, Uruguai
JD 3863	Córrego Tejera	Rio Uruguai	Durazno, Uruguai
JD 3869	Córrego Tejera	Rio Uruguai	Durazno, Uruguai
JD 3870	Córrego Tejera	Rio Uruguai	Durazno, Uruguai
JD 3871	Córrego Tejera	Rio Uruguai	Durazno, Uruguai
AL 50	Rio Aguapey	Rio Aguapey	Corrientes, Argentina
SA 03	Rio Das Velhas	Rio São Francisco	Curvelo /MG
SA 29	Rio Das Velhas	Rio São Francisco	Curvelo /MG
SA 35	Rio Das Velhas	Rio São Francisco	Curvelo /MG

ANEXO 02

Ocorrência de peixes de água doce com distribuição na costa leste do Brasil. As espécies de ampla distribuição no continente bem como aquelas endêmicas a uma única bacia não foram incluídas, uma vez que o objetivo desta revisão era a busca de concordâncias e discordâncias na distribuição de espécies com relação aos dados moleculares. SF compreende espécies com limite sul na bacia do rio Buranhém; SE compreende espécies distribuídas entre o rio Jucuruçu e a bacia do rio Doce; RJ compreende espécies restritas ao norte do estado do Rio de Janeiro, de Itabapoana até São João; SL compreende espécies distribuídas em rios com drenagens para baía de Guanabara até a região Sul do país.

Os números 1 e 2 sobre os nomes específicos indicam, respectivamente: presença na bacia do rio Paraná e presença na bacia do rio São Francisco. CL = Check List of Freshwater Fishes of South and Central América e; ND = NEODAT. Espécies de distribuição costeira cujas referências não foram suficientes para uma boa precisão de sua distribuição, não estão presentes neste anexo.

Espécie	SF	SE	RJ	SL	Referência
CHARACIFORMES					
<i>Apareiodon itapicuruensis</i>	X				ND
<i>Cyphocharac gilbert²</i>	X	X	X	X	Vari, 1992
<i>C. santacatarinae</i>				X	Vari, 1992
<i>Steindachnerina elegans</i>	X				Vari, 1991
<i>Prochilodus hartii</i>	X				Castro, 1990
<i>P. lineatus</i>		X			Castro, 1990
<i>P. vimboides^{1,2}</i>	X	X			Castro, 1990
<i>Leporinus bahiensis</i>	X				Garavello, 1979
<i>L. conirostris</i>		X	X		Garavello, 1979
<i>L. copelandii</i>	X	X			Garavello, 1979
<i>L. melanopleura</i>	X				Garavello, 1979
<i>L. mormyrops</i>		X	X		Garavello, 1979
<i>L. octofasciatus</i>				X	Garavello, 1979
<i>L. steindachneri</i>	X	X			Garavello, 1979
<i>L. thayeri</i>	X		X		Garavello, 1979

continua →

Espécie	SF	SE	RJ	SL	Referência
<i>Characidium grajahuensis</i>				X	CL
<i>C. interruptum</i>			X	X	CL; ND
<i>C. japuhybense</i>				X	CL
<i>C. lanei</i>				X	CL
<i>C. oiticicae</i> ¹				X	CL
<i>C. pterostictum</i>				X	CL
<i>C. schubarti</i>				X	CL
<i>Astyanax giton</i>			X	X	CL; Melo 2000
<i>A. hastatus</i>				X	CL; Melo 2000
<i>A. intermedius</i>			X		CL; Melo 2000; ND
<i>A. janeiroensis</i>				X	Melo, 2000
<i>A. parahybae</i>			X		CL; Melo 2000
<i>A. ribeirae</i>				X	ND
<i>A. taeniatus</i>		X	X	X	CL; Melo 2000
<i>Hollandichthys multifasciatus</i>				X	CL
<i>Hyphessobrycon bifasciatus</i>		X	X	X	CL; ND
<i>H. duragenis</i> ¹			X		CL
<i>H. flammeus</i>		X	X		CL; ND
<i>H. griemi</i>				X	CL
<i>H. luetkenii</i>		X	X	X	CL
<i>H. reticulatus</i>			X	X	CL
<i>Moenkhausia costae</i> ²	X				CL
<i>M. doceana</i>		X			CL
<i>Oligosarcus acutirostris</i>		X			Menezes, 1987; 1988
<i>O. argenteus</i>		X			Menezes, 1987; 1988
<i>O. hepsetus</i>			X	X	Menezes, 1988
<i>O. macrolepis</i>	X				Menezes, 1988
<i>Probolodus heterostomus</i>			X		CL
<i>Rachoviscus crassiceps</i>				X	CL
<i>R. graciliceps</i>	X	X			ND
<i>Acinocheiroidon melanogramma</i>	X				CL
<i>Spintherobolus ankoseion</i>				X	CL
<i>S. broccae</i>				X	CL
<i>S. leptoura</i>				X	CL
<i>Mimagoniates lateralis</i>				X	CL; Weitzman <i>et al.</i> , 1988
<i>M. microlepis</i>		X	X	X	CL; Weitzman <i>et al.</i> , 1988
<i>M. sylvicola</i>		X			CL; Weitzman <i>et al.</i> , 1988
<i>P. heterandria</i>				X	CL; Weitzman <i>et al.</i> , 1988
SILURIFORMES					
<i>Homodiaetus banguela</i>				X	CL
<i>H. graciosa</i>				X	CL
<i>H. passarellii</i>				X	CL

continua →

Espécie	SF	SE	RJ	SL	Referência
<i>Ituglanis parahybae</i>			X		CL
<i>Listrura boticario</i>				X	CL
<i>L. compositi</i>				X	CL
<i>L. nematopteryx</i>				X	CL
<i>L. tetraradiata</i>				X	CL
<i>Microcambeva barbata</i>		X	X		CL
<i>Trichogenes longipinnis</i>				X	CL
<i>Trichomycterus alternatus</i>		X	X		CL
<i>T. brasiliensis</i> ²		X			CL
<i>T. davisii</i> ¹				X	CL
<i>T. immaculatus</i>			X		CL
<i>T. nigricans</i>				X	CL
<i>T. zonatus</i>				X	CL
<i>Aspidoras maculosus</i>	X				CL
<i>A. virgulatus</i>		X			CL
<i>Corydoras barbatus</i>				X	CL
<i>C. erhardti</i> ¹				X	CL
<i>C. macropterus</i> ¹				X	CL
<i>C. nattereri</i>		X	X	X	CL
<i>C. prionotus</i>		X	X	X	CL
<i>C. steindachneri</i>				X	CL
<i>Hisonotus notatus</i>			X		CL
<i>Otocinclus affinis</i>			X		CL
<i>Otothyris lophophanes</i>			X		CL
<i>O. travassosi</i>		X			CL
<i>Pseudotothyris janeirensis</i>				X	CL
<i>Harttia gracilis</i> ¹			X		CL
<i>Loricariichthys anus</i> ¹				X	CL
<i>L. castaneus</i>		X	X	X	CL
<i>Rinelocaria nigricauda</i>				X	CL
<i>Plecostomus obtusirostris</i>				X	CL
<i>Delturus angulicauda</i>		X			CL
<i>D. carinotus</i>		X			CL
<i>D. parahybae</i>			X		CL
<i>Hemipsilichthys bahianus</i>	X				CL
<i>Kronichthys heylandi</i>				X	CL
<i>K. lacerta</i>				X	CL
<i>Pogonopoma wertheimeri</i>		X			CL
<i>Ancistrus multispinis</i>				X	CL
<i>Acentronichthys leptos</i>		X	X	X	CL
<i>Pimelodella eigenmanni</i>			X		CL
<i>Steindachneridion parahybae</i>	X		X		CL

continua →

Espécie	SF	SE	RJ	SL	Referência
<i>G. machadoi</i>			X	X	CL
<i>Potamarius grandoculis</i>		X	X		CL
<i>Wertheimeria maculata</i>	X				CL
<i>Pseudachenipterus affinis</i>		X			CL
<i>Trachelyopterus striatulus</i>		X	X		CL
GYMNOTIFORMES					
<i>Gymnotus pantherinus</i>				X	CL
<i>Gymnotus sylvius</i>			X	X	CL
<i>Rhamphichthys rostratus</i>	X				CL
<i>Brachyhypopomus janeiroensis</i>			X		CL
CYPRINIFORMES					
<i>Phalloceros caudimaculatus</i>		X	X	X	CL; ND
<i>P. januarius</i>			X	X	CL; ND
PERCIFORMES					
<i>Pachyurus adpersus</i>		X	X		CL
<i>Geophagus brasiliensis</i>		X	X	X	CL

ANEXO 03

Divergência genética entre cada par de haplótipo de *Hoplias malabaricus*

	Aguapey	SF 01	SF 02	SF 03	PA 01	CO 01	CO 02	PD 01	JQ 01	JQ 02	JQ 03	JQ 04	JQ 05	BU 01	BU 02	BU 03	JU 01	IN 01	IN 02	MU 01	MU 02	
SF 01	0,083																					
SF 02	0,083	0																				
SF 03	0,078	0,007	0,007																			
PA 01	0,084	0,015	0,015	0,013																		
CO 01	0,08	0,006	0,006	0,004	0,012																	
CO 02	0,083	0,015	0,015	0,013	0,003	0,012																
PD 01	0,084	0,016	0,016	0,015	0,004	0,013	0,004															
JQ 01	0,083	0,006	0,006	0,004	0,012	0,003	0,012	0,013														
JQ 02	0,083	0,006	0,006	0,004	0,012	0,003	0,012	0,013	0													
JQ 03	0,086	0,024	0,024	0,022	0,03	0,021	0,03	0,031	0,019	0,019												
JQ 04	0,083	0,006	0,006	0,004	0,012	0,003	0,012	0,013	0	0	0,019											
JQ 05	0,083	0,006	0,006	0,004	0,012	0,003	0,012	0,013	0	0	0,019	0										
BU 01	0,083	0,006	0,006	0,004	0,012	0,003	0,012	0,013	0	0	0,019	0	0									
BU 02	0,083	0,006	0,006	0,004	0,012	0,003	0,012	0,013	0	0	0,019	0	0	0								
BU 03	0,081	0,022	0,022	0,021	0,025	0,019	0,025	0,027	0,019	0,019	0,004	0,019	0,019	0,019	0,019							
JU 01	0,087	0,083	0,083	0,081	0,086	0,08	0,089	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08						
IN 01	0,087	0,083	0,083	0,081	0,086	0,08	0,089	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0					
IN 02	0,089	0,084	0,084	0,083	0,087	0,081	0,09	0,092	0,081	0,081	0,081	0,081	0,081	0,081	0,081	0,081	0,001	0				
MU 01	0,09	0,081	0,081	0,08	0,084	0,078	0,087	0,089	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,009	0,01	0,01			
MU 02	0,092	0,083	0,083	0,081	0,086	0,08	0,089	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,007	0,01	0,01	0,001		
SM 01	0,087	0,08	0,08	0,078	0,083	0,077	0,086	0,087	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,003	0	0	0,006	0,004	

	Aguapey	SF 01	SF 02	SF 03	PA 01	CO 01	CO 02	PD 01	JQ 01	JQ 02	JQ 03	JQ 04	JQ 05	BU 01	BU 02	BU 03	JU 01	IN 01	IN 02	MU 01	MU 02	SM 01
SM 02	0,089	0,081	0,081	0,08	0,084	0,078	0,087	0,089	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,004	0	0,01	0,007	0,006	0,001
SM 03	0,092	0,081	0,081	0,08	0,084	0,078	0,087	0,089	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,007	0,01	0,01	0,004	0,003	0,004
SM 04	0,089	0,083	0,083	0,081	0,086	0,08	0,089	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,007	0,01	0,01	0,004	0,003	0,004
DO 01	0,09	0,081	0,081	0,08	0,084	0,078	0,087	0,089	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078	0,006	0,01	0,01	0,003	0,001	0,003
DO 02	0,089	0,08	0,08	0,078	0,083	0,077	0,086	0,087	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,007	0,01	0,01	0,004	0,003	0,004
DO 03	0,087	0,08	0,08	0,078	0,083	0,077	0,086	0,087	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,006	0,01	0,01	0,006	0,004	0,003
IT 01	0,102	0,102	0,102	0,101	0,102	0,099	0,105	0,107	0,099	0,099	0,104	0,099	0,099	0,099	0,099	0,101	0,061	0,06	0,06	0,059	0,059	0,058
IT 02	0,102	0,102	0,102	0,101	0,102	0,099	0,105	0,107	0,099	0,099	0,104	0,099	0,099	0,099	0,099	0,101	0,061	0,06	0,06	0,059	0,059	0,058
PS 01	0,102	0,102	0,102	0,101	0,102	0,099	0,105	0,107	0,099	0,099	0,104	0,099	0,099	0,099	0,099	0,101	0,061	0,06	0,06	0,059	0,059	0,058
PS 02	0,112	0,111	0,111	0,107	0,111	0,108	0,114	0,115	0,108	0,108	0,112	0,108	0,108	0,108	0,108	0,109	0,071	0,07	0,07	0,072	0,072	0,071
MA 01	0,107	0,107	0,107	0,105	0,107	0,104	0,109	0,111	0,104	0,104	0,108	0,104	0,104	0,104	0,104	0,105	0,067	0,07	0,07	0,065	0,065	0,064
SJ 01	0,105	0,104	0,104	0,102	0,104	0,101	0,107	0,108	0,101	0,101	0,105	0,101	0,101	0,101	0,101	0,102	0,064	0,06	0,07	0,062	0,062	0,061
SJ 02	0,105	0,105	0,105	0,104	0,105	0,102	0,108	0,109	0,102	0,102	0,107	0,102	0,102	0,102	0,102	0,104	0,065	0,07	0,07	0,064	0,064	0,062
MC 01	0,107	0,096	0,096	0,092	0,104	0,093	0,102	0,107	0,093	0,093	0,098	0,093	0,093	0,093	0,093	0,098	0,084	0,08	0,09	0,081	0,083	0,081
RI 01	0,109	0,093	0,093	0,092	0,104	0,093	0,102	0,107	0,093	0,093	0,098	0,093	0,093	0,093	0,093	0,098	0,078	0,08	0,08	0,075	0,077	0,075
PE 01	0,111	0,095	0,095	0,093	0,105	0,095	0,104	0,108	0,095	0,095	0,099	0,095	0,095	0,095	0,095	0,099	0,08	0,08	0,08	0,077	0,078	0,077
uUR 01	0,109	0,093	0,093	0,092	0,104	0,093	0,102	0,107	0,093	0,093	0,098	0,093	0,093	0,093	0,093	0,098	0,078	0,08	0,08	0,075	0,077	0,075
IUR 01	0,007	0,08	0,08	0,075	0,084	0,077	0,083	0,084	0,08	0,08	0,081	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,087	0,09	0,09	0,09	0,092	0,087
IUR 02	0,007	0,08	0,08	0,075	0,084	0,077	0,083	0,084	0,08	0,08	0,081	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,087	0,09	0,09	0,09	0,092	0,087
IUR 03	0,093	0,09	0,09	0,086	0,096	0,087	0,093	0,098	0,087	0,087	0,089	0,087	0,087	0,087	0,087	0,089	0,089	0,09	0,09	0,086	0,087	0,086
IUR 04	0,093	0,09	0,09	0,086	0,096	0,087	0,093	0,098	0,087	0,087	0,089	0,087	0,087	0,087	0,087	0,089	0,089	0,09	0,09	0,086	0,087	0,086
IUR 05	0,095	0,089	0,089	0,084	0,098	0,086	0,095	0,099	0,086	0,086	0,087	0,086	0,086	0,086	0,086	0,087	0,09	0,09	0,09	0,087	0,089	0,087

	SM 02	SM 03	SM 04	DO 01	DO 02	DO 03	IT 01	IT 02	PS 01	PS 02	MA 01	SJ 01	SJ 02	MC 01	RI 01	PE 01	uUR 01	IUR 01	IUR 02	IUR 03	IUR 04	
SM 03	0,006																					
SM 04	0,006	0,003																				
DO 01	0,004	0,001	0,001																			
DO 02	0,006	0,003	0,003	0,001																		
DO 03	0,004	0,004	0,004	0,003	0,001																	
IT 01	0,059	0,059	0,056	0,058	0,056	0,058																
IT 02	0,059	0,059	0,056	0,058	0,056	0,058	0															
PS 01	0,059	0,059	0,056	0,058	0,056	0,058	0	0														
PS 02	0,072	0,072	0,07	0,071	0,07	0,071	0,02	0,02	0,019													
MA 01	0,065	0,065	0,062	0,064	0,062	0,064	0,01	0,01	0,009	0,016												
SJ 01	0,062	0,062	0,059	0,061	0,059	0,061	0,01	0,01	0,006	0,013	0,003											
SJ 02	0,064	0,064	0,061	0,062	0,061	0,062	0,01	0,01	0,007	0,015	0,001	0,001										
MC 01	0,083	0,083	0,08	0,081	0,083	0,084	0,09	0,09	0,087	0,086	0,087	0,084	0,086									
RI 01	0,077	0,077	0,074	0,075	0,077	0,078	0,08	0,08	0,084	0,083	0,084	0,081	0,083	0,009								
PE 01	0,078	0,078	0,075	0,077	0,078	0,08	0,09	0,09	0,086	0,084	0,086	0,083	0,084	0,01	0							
uUR 01	0,077	0,077	0,074	0,075	0,077	0,078	0,08	0,08	0,084	0,083	0,084	0,081	0,083	0,009	0	0,001						
IUR 01	0,089	0,092	0,089	0,09	0,089	0,087	0,11	0,11	0,108	0,118	0,112	0,111	0,111	0,104	0,11	0,108	0,107					
IUR 02	0,089	0,092	0,089	0,09	0,089	0,087	0,11	0,11	0,108	0,118	0,112	0,111	0,111	0,104	0,11	0,108	0,107	0				
IUR 03	0,087	0,087	0,084	0,086	0,084	0,086	0,09	0,09	0,093	0,098	0,098	0,096	0,096	0,077	0,07	0,075	0,074	0,086	0,086			
IUR 04	0,087	0,087	0,084	0,086	0,084	0,086	0,09	0,09	0,093	0,098	0,098	0,096	0,096	0,077	0,07	0,075	0,074	0,086	0,086	0		
IUR 05	0,089	0,089	0,086	0,087	0,086	0,087	0,1	0,1	0,095	0,099	0,099	0,098	0,098	0,075	0,07	0,074	0,072	0,087	0,087	0,001	0,001	