

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS
NATURAIS – PPGBTRN**

**História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon*
Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica**

DANIEL TOFFOLI RIBEIRO

Manaus – AM
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS
NATURAIS – PPGBTRN**

**História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon*
Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica**

DANIEL TOFFOLI RIBEIRO

ORIENTADORA: Dra. IZENI PIRES FARIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus – AM
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

R 484 Ribeiro, Daniel Toffoli
 História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877
 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica /Daniel Toffoli Ribeiro .--- Manaus :
 [s.n.], 2007.
 xiii, 114 p. : il., mapas

 Dissertação (mestrado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2007
 Orientador : Farias, Izeni Pires
 Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

 1. Potamotrygon. 2. Arraias-de-água-doce. 3. Filogenia. 4. Filogeografia.
 5. Radiação. 6. DNA barcoding. I. Título.

CDD 597.350415

SINOPSE

Foram geradas hipóteses filogenéticas baseadas em segmento dos genes mitocondriais ATPase 6/8 e COI, com nove das 18 espécies válidas e duas não-descritas da família Potamotrygonidae. *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon* sp.1 e *P. schroederi* surgiram em um curto espaço de tempo evolutivo, há cerca de 8 milhões de anos atrás. O surgimento de um grupo de espécies do gênero *Potamotrygon* (aqui denominado roseta-ocelado) se deu nos últimos dois milhões de anos atrás, em um curto espaço de tempo evolutivo, representando um evento de radiação. Essa radiação provavelmente foi causada pela transposição do Arco do Purus pelo ancestral do grupo, seguida de posteriores eventos de especiação por meio de colonização/fragmentação ocorridos nos tributários do médio e baixo rio Amazonas, devido a prováveis mudanças no nível das águas causadas pelas oscilações climáticas do Pleistoceno. Pelo menos cinco linhagens evolutivas distintas existem no complexo *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina*, que ocorrem nos tributários do rio Amazonas, todas mais proximamente relacionadas a *P. motoro*. Há uma forte associação entre haplótipos e localidades geográficas nesse complexo, com padrões de cor (que geralmente são utilizados para definir espécies) replicados em diferentes linhagens. A aplicação da metodologia do DNA *barcoding* em Potamotrygonidae é válida para designar espécimes às respectivas espécies, com exceção do complexo *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* que compartilham haplótipos, mas não para identificar novas espécies.

Aos meus pais, Carlos R. Ribeiro e Eleonora E. Toffoli Ribeiro
Às minhas avós Zenaide Ribeiro e Alda Toffoli (*in memoriam*)
À minha irmã, Camila Toffoli Ribeiro
À minha querida Fabiana Ferraz Aud
Aos irmãos Jaraqui

AGRADECIMENTOS

Apesar de se tratar de um trabalho científico, eu gostaria de expressar minha gratidão a Deus. Passei por dificuldades ao longo dessa jornada do Mestrado que serviram para aguçar o reconhecimento de minhas limitações e reforçar minha fé.

Agradeço a todas as pessoas que fizeram esse trabalho junto comigo. Mais do que nunca, acredito que a ciência deve ser feita por um grupo, um time de pessoas se ajudando mutuamente, e fico feliz por poder escrever que esse trabalho foi realizado dessa forma.

Agradeço aos meus queridos pais, Carlos Roberto Ribeiro e Eleonora Estela Toffoli Ribeiro, pelo constante apoio afetivo e sábios conselhos de vida. Também senti muito a importância da minha família, que dá uma base de sustentação aonde quer que eu vá.

Agradeço a Fabiana, pelo afeto e compreensão para comigo nos momentos difíceis por que passei. E por escolher traçar suas lutas ao meu lado.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório que, de uma forma ou de outra, todos me ajudaram, com ensinamentos das técnicas laboratoriais e também pelo convívio. Alexandre, Áureo, Adam, Edvaldo, Mário, Rafaela, Waleska, Yane, Cleiton, Andréa, Manuela, Themis, Neves e ao Will, especialmente a este último por ter me ensinado a maioria das análises laboratoriais e também computacionais.

Quero agradecer aos meus companheiros da Vila Jaraqui, ao César Haag, ao Léo Rodrigues e ao Will. Foram irmãos que ganhei nesse período do mestrado.

Agradeço a Maria Lúcia Góes de Araújo, pessoa quem buscou contato com a Izeni para desenvolver trabalho com as arraias. Durante esse período foi uma grande parceira de pesquisa, trocando informações e idéias. Devo muito desse trabalho a ela.

Agradeço também a Patrícia Charvet-Almeida, e Mauricio Pinto de Almeida, pelas discussões acerca de taxonomia, biologia e evolução dos potamotrigonídeos, além de fornecerem amostras para esse trabalho. Agradeço particularmente a Patrícia, com quem pude discutir mais e aprender muito. Agradeço também ao Getulio Rincon, pelas discussões sobre taxonomia de potamotrigonídeos.

Agradeço a Angela Maria Leguizamon Vega pelas discussões acerca da geologia da bacia Amazônica. Ao professor Monjeló por permitir a utilização da sala de análise de dados genéticos e o acesso aos computadores.

Aos professores Jorge Porto, Mario Conhaft e Marcelo Carvalho pelas valiosas contribuições para o meu plano de pesquisa, e a esse último, pelo fornecimento de bibliografia.

Agradeço ao pessoal do PROBIO, especialmente ao Rafael Bernhard, pelo zelo com que me passou os dados; a Stuart Willis, a Sara Mello, Patrícia Charvet-Almeida, Mauricio Pinto de Almeida, Getulio Rincon, pelo fornecimento de material. Ao Instituto Piagaçu Purus por emprestar suas instalações.

Agradeço, não sei como expressar o quanto por palavras, ao professor Tomas Hrbek. O professor Tomas me ensinou muito tanto da parte técnica, quanto teórica acerca de Biologia Evolutiva. Ele também me acompanhou de muito perto e me ajudou no processo estressante de conclusão da dissertação.

Agradeço, com uma reverência especial, à minha orientadora, professora Izeni Pires Farias. Desde o começo do meu mestrado ela me acompanhou de muito perto, me incentivando, cobrando, ensinando e dando-me liberdade para desenvolver meu trabalho. Não consigo enxergar um orientador melhor, agradeço também pelo apoio e compreensão pessoal que ela sempre cultivou.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM; ao curso de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e a todos os professores a ele vinculados.

Agradeço em especial a professora Eliana Feldberg por todo o apoio e solicitude durante o meu curso.

Agradeço a Universidade Federal do Amazonas pela utilização do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) coordenado pela professora Izeni Pires Farias.

Quero agradecer ao Johnson, e, especialmente a Dina, pela solicitude com que eles aplicaram minhas placas de DNA.

Agradeço a CAPES pela concessão de bolsa de estudos. Essa pesquisa foi financiada em parte por concessão de pesquisa da *International Foundation for Science* (IFS) e programa BECA. Permissão para condução de trabalho de campo e coleta de tecidos foi concedida pelo IBAMA (Licença N° 05/2005) e condução de acesso genético por CGEN/IBAMA (Deliberação N° 025/2005).

PREFÁCIO

Decidi trabalhar com as arraias de água doce da família Potamotrygonidae mais por forças das circunstâncias do que por uma escolha por interesse pessoal nesse grupo taxonômico. Como grande parte dos meus colegas de Mestrado, vim para Manaus perseguindo meu sonho de conhecer e estudar a maravilhosa biodiversidade amazônica, além da boa estrutura que a pós-graduação INPA/UFAM oferece. Chegando em Manaus, a minha orientadora sugeriu duas possibilidades de trabalho e eu prontamente fiquei intrigado e curioso para estudar as arraias de água doce. Eu sequer sabia da existência desses bichos! Em retrospectiva, hoje vejo que a minha escolha não poderia ter sido mais acertada. A família Potamotrygonidae apresenta peculiaridades biológicas que tornam o estudo desse grupo fascinante. É o único táxon supraespecífico dentro de Chondrichthyes que é adaptado exclusivamente à vida em água doce. As arraias dessa família apresentam um ferrão recoberto por veneno, sendo uma das principais causas de acidentes em beiras de corpos d'água onde ocorrem. Esses animais também são apreciados como peixes ornamentais, principalmente no mercado internacional, comércio que vem crescendo e cujo impacto nas populações naturais deve ser monitorado. Por fim, a taxonomia, sistemática e distribuição das espécies do grupo estão longe de serem bem conhecidas, com muitas espécies apresentando complexos padrões de policromatismo e sobreposição de caracteres morfométricos e padrões de cor com outras espécies.

O presente trabalho enfoca e pretende contribuir na geração de conhecimentos para a elucidação da taxonomia, sistemática e distribuição das espécies da família, conhecimentos que podem ser usados para subsidiar planos de conservação e manejo das espécies da família. A dissertação é dividida em uma introdução geral e três

capítulos, o primeiro consistindo em hipótese filogenética e biogeográfica da família. O segundo capítulo trata da delimitação das espécies altamente policromáticas *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, e *P. scobina*, e sugestão de história evolutiva para esse grupo. O terceiro capítulo trata da avaliação da metodologia denominada DNA *barcoding*, que pretende delimitar espécies por meio de distância genética do gene mitocondrial Citocromo *c* Oxidase I.

RESUMO

O ancestral da família Potamotrygonidae adaptou-se ao ambiente de água doce há cerca de 20 milhões de anos atrás a partir do noroeste da América do Sul. Desde então, o grupo irradou em cerca de 20 espécies, classificados em três gêneros. No presente estudo foi demonstrado que o surgimento de *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon* sp.1 e *P. schroederi* ocorreu em um curto espaço de tempo evolutivo há cerca de 7 milhões de anos atrás. A origem da maior parte das espécies do gênero *Potamotrygon*, aqui denominado grupo roseta-ocelado, um complexo de ao menos seis espécies, se deu aproximadamente nos últimos dois milhões de anos atrás. Essa diversificação ocorreu de forma extremamente rápida, o que impossibilita a reconstrução das relações filogenéticas entre essas espécies. O recente e rápido surgimento dessas espécies provavelmente está relacionado com a transposição do Arco do Purus pelo ancestral do grupo, seguido da colonização dos tributários da Amazônia leste e posterior isolamento, provavelmente relacionado com mudanças no nível das águas pelas oscilações climáticas do Pleistoceno. Análises filogeográficas e genético-populacionais demonstraram a existência de pelo menos cinco linhagens evolutivas distintas quando as espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* foram analisadas em conjunto. Essas linhagens evolutivas ocorrem nos tributários do médio e baixo rio Amazonas, todas mais proximamente relacionadas a *P. motoro*. Foi demonstrada uma forte associação entre haplótipos e localidades geográficas, com padrões de cor replicados em diferentes linhagens. A espécie *P. orbignyi* é polifilética, e deve ser revisada. A aplicação da metodologia do DNA barcoding nas espécies da família Potamotrygonidae é válida para designar espécimes às respectivas espécies, com exceção do complexo *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* que compartilham

extensivamente haplótipos. Entretanto essa metodologia não é válida para identificar novas espécies, para o que devem ser utilizadas informações complementares.

ABSTRACT

The ancestors of the family Potamotrygonidae have adapted to freshwater environment about 20 millions years before present, colonizing the continental South America from the Caribbean region. Since then, the group has radiated to about 20 species classified in three genera. In the present study it was demonstrated that the species *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon* sp.1 and *P. schroederi*, which represent the root of the potamotrigonid radiation, have diverged within a short period of time around 7 millions years before present. The origin of the majority of the species of the genus *Potamotrygon*, here denominated roseta-ocelado group, a complex of at least six species, has begun in the last 2 millions years before present. This diversification has occurred extremely rapidly, which makes the reconstruction of the phylogenetic relationships among these species very difficult. The recent and rapid origin of the species of the roseta-ocelado group is probably related to the breach of the Purus Arch by the ancestral of the group, followed by the colonization of Amazonas River tributaries of eastern Amazônia and their isolation which most likely was caused by changes in water level caused by climatic oscillations in Pleistocene. Phylogeographic and population genetic analyses demonstrated the existence of at least five distinct evolutionary lineages when the species *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* were analyzed together. These distinct lineages occur in tributaries of middle and lower Amazonas River, all more closely related to *P. motoro*. There is a strong association between haplotypes and geographic localities, and replicated color patterns in different lineages found at different geographic localities. As currently defined, *Potamotrygon orbignyi* is polyphyletic and should be taxonomically revised. The application of DNA barcoding methodology to species of the family Potamotrygonidae is only valid for assignment of specimens to its species, with exception of the species of the complex *P.*

motoro, *P. orbigny* and *P. scobina* which share haplotypes extensively. However, the barcoding methodology is not valid for the identification of new species which should be done in conjunction with other information.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
AGRADECIMENTOS	v
PREFÁCIO	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
SUMÁRIO	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xix
INTRODUÇÃO GERAL	1
História evolutiva e sistemática	1
Distribuição geográfica	2
Biologia	2
Os potamotrigonídeos e a conservação biológica	3
CAPÍTULO 1 - Sistemática filogenética e biogeografia da família Potamotrygonidae	6
1.1 INTRODUÇÃO	6
1.2 OBJETIVOS	9
1.2.1 <i>Objetivo geral</i>	9
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	9
1.3 MATERIAL E MÉTODOS	10
1.3.1 <i>Amostragem</i>	10
1.3.2 <i>Extração de DNA, amplificação e seqüenciamento</i>	12
1.3.3 <i>Alinhamento Filogenético</i>	13
1.3.4 <i>Análise filogenética</i>	14
1.4 RESULTADOS	17
1.4.1 <i>Análise filogenética</i>	17
1.5 DISCUSSÃO	35
1.5.1 <i>Filogenia da família Potamotrygonidae – A “Radiação”</i>	35
1.5.2 <i>Biogeografia da família Potamotrygonidae</i>	37
1.5.2.1 <i>Origem e diversificação inicial da família Potamotrygonidae</i>	37
1.5.2.2 <i>Origem do grupo roseta-ocelado</i>	39
CAPÍTULO 2 - Filogeografia de <i>Potamotrygon motoro</i> (Potamotrygonidae) na bacia Amazônica, e discussão sobre delimitação taxonômica de	

<i>Potamotrygon orbignyi e Potamotrygon scobina</i>	43
2.1 INTRODUÇÃO	43
2.2 OBJETIVOS	51
2.2.1 <i>Objetivo geral</i>	51
2.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	51
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	52
2.3.1 <i>Amostragem</i>	52
2.3.2 <i>Extração de DNA, amplificação e seqüenciamento</i>	52
2.3.3 <i>Rede de haplótipos (haplotype networks) e análise dos cladogramas hierarquizados (NCA)</i>	55
2.3.4 <i>Análises Estatísticas Populacionais</i>	56
2.4 RESULTADOS	58
2.4.1 <i>Rede de haplótipos e NCA</i>	58
2.4.2 <i>Análise genético-populacional e demográfica</i>	62
2.5 DISCUSSÃO	68
2.5.1 <i>Demografia histórica</i>	68
2.5.2 <i>Variação genética interpopulacional</i>	71
2.5.3 <i>Variabilidade genética intrapopulacional</i>	72
2.5.4 <i>Conclusão</i>	73
CAPÍTULO 3 - Teste da utilidade do DNA <i>barcoding</i> na radiação do gênero de arraias de água doce do gênero <i>Potamotrygon</i> (<i>Potamotrygonidae</i>: <i>Myliobatiformes</i>)	77
3.1 INTRODUÇÃO	77
3.2 OBJETIVOS	79
3.2.1 <i>Objetivo geral</i>	79
3.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	79
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	80
3.3.1 <i>Amostragem</i>	80
3.3.2 <i>Extração de DNA, amplificação e seqüenciamento</i>	82
3.3.3 <i>Alinhamento Filogenético</i>	83
3.3.4 <i>Análise filogenética e teste de hipóteses</i>	83
3.4 RESULTADOS	84
3.4.1 <i>Análise filogenética</i>	85
3.4.2 <i>Teste de hipóteses</i>	90
3.5 DISCUSSÃO	92

3.5.1 <i>Potamotrygon motoro</i> , <i>Potamotrygon scobina</i> e <i>Potamotrygon orbignyi</i>	93
3.5.2 <i>Relações filogenéticas dentro do clado roseta-ocelado – “A radiação”</i>	94
3.5.3 <i>Enraizando Potamotrygonidae</i>	95
3.5.4 <i>DNA Barcoding</i>	97
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXO I - Espécimes estudados e localização geográfica	114
ANEXO II - Haplótipos do gene ATPase subunidades 6 e 8 (780pb) utilizados para a análise NCA e genética de populações	120
ANEXO III - Espécimes da família Potamotrygonidae analisados nesse estudo	124

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Tempo de divergência a partir de calibração com dados de Lovejoy *et al.* (1998). e Marques (2000).....32
- Tabela 2.** Resultado das análises do agrupamento dos cladogramas hierarquizados. Exibidos somente cladogramas com permutações significativas (X^2) para estrutura geográfica.....61
- Tabela 3.** Índices de diversidade genética e testes de neutralidade seletiva para cada espécie por localidade, onde $N = N^\circ$ amostral. Nota: * $P < 0,05$63
- Tabela 4.** Comparações par a par dos valores de F_{ST} entre as populações e espécies analisadas. Valores em azul correspondem a valores significativos antes da correção de Bonferroni ($P < 0,05$) e em vermelho a valores significativos após a correção de Bonferroni ($P < 0,00036$).....65
- Tabela 5.** Comparações par a par dos valores de Nm entre as populações e espécies analisadas. Os valores em vermelho correspondem a ausência de fluxo gênico significativo.....66
- Tabela 6.** Análise da Variância Molecular (AMOVA) considerando somente populações de *Potamotrygon motoro*. As localidades amostradas não formam uma única população panmítica na bacia Amazônica ($P < 0,001$).....67
- Tabela 7.** Análise da Variância Molecular (AMOVA) considerando somente as populações de *Potamotrygon motoro* do rio Negro distanciadas a menos de 100 Km entre si (Itu, Demini, Ararirrá, Cuiuni). As localidades amostradas não formam uma única população panmítica ($P = 0,0311$).....67
- Tabela 8.** Análise da Variância Molecular (AMOVA) considerando as populações de tributários do rio Negro na margem esquerda (Itu e Demini) como grupos distintos da margem direita (Ararirrá e Cuiuni). Os grupos em margens opostas não foram considerados estatisticamente significantes ($P = 0,687$).....67
- Tabela 9.** Espécies analisadas para DNA *barcoding* e localidades de coleta.....81
- Tabela 10.** Distâncias entre espécies do grupo externo e média de Potamotrygonidade, sob o modelo de evolução K2P and GTR + inv.....86
- Tabela 11.** Distâncias genéticas máxima e mínima entre espécies usando modelo de substituição K2P. Em negrito, distâncias entre os taxa polifiléticos (sensu Funk & Omland, 2003) *Potamotrygon motoro*, *P. scobina* e *P. orbignyi*. Sobre a linha de separação está a variabilidade intraespecífica. Notar que a distância em negrito está dentro do espectro de variabilidade intraespecífica e não pode ser usada para discriminar espécies.....88
- Tabela 12.** Distâncias genéticas máxima e mínima entre espécies usando modelo de substituição GTR + inv. Notar que as distâncias genéticas entre espécies mais distantes relacionadas tendem a ser maiores que as distâncias dadas pelo modelo de

substituição K2P. O modelo de substituição GTR + inv é mais complexo, e corrige melhor para substituições múltiplas em sítios nucleotídicos.....89

Tabela 13. Resultados dos testes de restrição ML para aferir monofiletismo das espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina*. * P < 0.05.....91

Tabela 14. Resultados dos testes de restrição NJ para aferir monofiletismo das espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina*. * P < 0.05.....91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica das amostras de cada espécie analisadas nesse estudo.....	11
Figura 2. Árvore filogenética ATPase 6/8 – Análise Bayesiana.....	19
Figura 3. Árvore filogenética ATPase 6/8 – Análise Máxima Verossimelhança.....	20
Figura 4. Árvore filogenética ATPase 6/8 – Análise Máxima Parcimônia.....	21
Figura 5. Árvore filogenética ATPase 6/8 – Análise Neighbor Joining.....	22
Figura 6. Árvore filogenética COI – Análise Bayesiana.....	23
Figura 7. Árvore filogenética COI – Análise Máxima Verossimelhança.....	24
Figura 8. Árvore filogenética COI – Análise Máxima Parcimônia.....	25
Figura 9. Árvore filogenética COI – Análise Neighbor Joining.....	26
Figura 10. Árvore filogenética ATPase 6/8 + COI – Análise Bayesiana.....	27
Figura 11. Árvore filogenética ATPase 6/8 + COI – Análise Máxima Verossimelhança	28
Figura 12. Árvore filogenética ATPase 6/8 + COI – Análise Máxima Parcimônia.....	29
Figura 13. Árvore filogenética ATPase 6/8 + COI - Análise Neighbor Joining.....	30
Figura 14. Árvore filogenética calibrada por dados de Lovejoy <i>et al.</i> (1998).....	33
Figura 15. Árvore filogenética calibrada por dados de Marques (2000).....	34
Figura 16. Distribuição geográfica de <i>Potamotrygon motoro</i> (conforme Rosa, 1985a).	47
Figura 17. Distribuição geográfica de <i>Potamotrygon orbignyi</i> (conforme Rosa, 1985a)	48
Figura 18. Distribuição geográfica de <i>Potamotrygon scobina</i> (conforme Rosa, 1985a)	48
Figura 19. Mapa da distribuição geográfica das amostras utilizadas nas análises de genética populacional. Destacado populações do médio rio Negro.....	53
Figura 20. Rede haplotípica de clados hierarquizados por meio da análise NCA.....	60

Figura 21. Representação esquemática da topologia do grupo interno que é a mesma para os três métodos de inferência filogenética. Setas representam pontos de enraizamento das diferentes análises a) raiz *Neighbor-joining*; b) raiz *Bayesian-likelihood*; c) raiz *Maximum-likelihood*. Ver texto para discussão.....96

INTRODUÇÃO GERAL

História Evolutiva e Sistemática

A família de arraias-de-água-doce Potamotrygonidae Garman, 1877 é um grupo monofilético (Rosa, 1985b; Lovejoy, 1996; Lovejoy *et al.*, 1998; Marques, 2000; Carvalho *et al.*, 2004b) pertencente à ordem Myliobatiformes (araias-com-ferrão), composta por 18 a 20 espécies válidas (Rosa, 1985b; Carvalho *et al.*, 2003). O provável clado-irmão do grupo, (*Himantura schmardae* + *H. pacifica*, de acordo com Lovejoy (1996) e Marques (2000)), ocorre nos mares do caribe, o que fez com que Lovejoy *et al.* (1998), baseados em estudo de filogenia e relógio molecular, propusessem que o ancestral comum da família Potamotrygonidae tenha invadido águas continentais a partir do norte da América do Sul entre 23 e 15 milhões de anos atrás, período em que ocorreu uma grande transgressão marinha. Marques (2000), baseado em relógio molecular, encontrou idade de origem da família em cerca de 18 milhões de anos atrás, resultado compatível com Lovejoy *et al.* (1998; mas ver Carvalho *et al.*, 2004b para hipótese alternativa). Provavelmente outros grupos marinhos também tenham se adaptado aos ambientes de água doce da América do Sul a partir dessa transgressão (e.g. peixes-agulha: Belonidae Lovejoy & de Araújo, 2000).

A família Potamotrygonidae é dividida em três gêneros (*Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon*). O gênero *Paratrygon* é monotípico, porém uma espécie ainda não descrita, mas proximamente relacionadas a *Paratrygon* foi encontrada no Rio Orinoco (citado em Carvalho *et al.*, 2003). O gênero *Plesiotrygon* também é monotípico, mas uma forma adicional que pode representar uma nova espécie foi reportada na literatura de aquaristas devendo ser confirmada (Carvalho *et al.*, 2003). O

gênero *Potamotrygon*, como atualmente reconhecido, é representado por 16 a 18 espécies (Rosa, 1985b; Carvalho *et al.*, 2003). No entanto algumas espécies com ampla distribuição geográfica podem ser subdivididas em novas espécies (e.g. *Potamotrygon motoro* e *P. orbignyi*, Carvalho *et al.*, 2003). O trabalho de taxonomia da família é ainda bastante incompleto, com ao menos cinco novas espécies descobertas aguardando descrição formal (Carvalho *et al.*, 2003). Esse trabalho é dificultado pelo fato de que muitas espécies da família são pobremente descritas; falta de material adequado e; presença de grande variação intraespecífica de coloração e sobreposição de coloração, caracteres merísticos e morfométricos entre espécies (Carvalho *et al.*, 2003, obs. pessoal).

Distribuição Geográfica

As espécies da família Potamotrygonidae ocorrem estritamente em águas continentais da América do Sul, na maioria dos sistemas de rios, com exceção daqueles que drenam para o Pacífico; na bacia do rio São Francisco; nos rios costeiros que drenam a partir da Mata Atlântica; na bacia do Paraná superior (colonizado após represamento das Sete Quedas) e rios ao sul do rio da Prata, Argentina (Rosa, 1985b).

Biologia

Os potamotrigonídeos ocupam uma série de habitats de água doce, incluindo a calha de grandes rios, praias, igapós, riachos com fundo argiloso ou pedregoso e lagos (Araújo, 1998, obs. pessoal). As arraias de água doce são predadoras, alimentando-se, quando adultas, principalmente de peixes, pequenos crustáceos e moluscos (Rincon,

2006). Quando jovens alimentam-se basicamente de insetos e pequenos crustáceos (Charvet-Almeida, 2006; Rincon, 2006). Os embriões são nutridos por secreção da mucosa viliforme do útero da mãe, denominada *trophonemata*, e daí o modo reprodutivo dos potamotrígonídeos ser denominado de viviparidade matrotrofica. O ciclo reprodutivo dos potamotrígonídeos parece estar relacionado com o ciclo hidrológico. A fecundidade varia de um a 20 embriões por período reprodutivo. A gestação varia de três a 12 meses. A época de nascimento dura de três a quatro meses (Almeida, com. pessoal).

Os potamotrígonídeos e a conservação biológica

Das cerca de 1000 espécies descritas de peixes cartilagosos (Classe Chondrycties) apenas 29 são adaptadas exclusivamente à vida em água doce, dessas 20 da família Potamotrygonidae (Carvalho *et al.*, 2003). A família Potamotrygonidae é o único táxon supraespecífico dentro de condricties em que todas as espécies são adaptadas exclusivamente à água doce, possuindo especializações morfológicas e fisiológicas para a vida neste tipo de ambiente, como incapacidade de retenção de uréia devido à ausência de excreção de sal pela glândula retal e modificações na ampola de Lorenzini (Garman, 1913). Apesar das adaptações à água doce, os potamotrígonídeos apresentam uma série de características biológicas herdadas de seu ancestral marinho, que provavelmente surgiram como adaptação à vida nos oceanos, ambientes bem mais estáveis que ambientes de água doce (Compagno & Cook, 1995). Lento crescimento, maturação sexual tardia e baixa fecundidade são características encontradas em todos os potamotrígonídeos e nos condricties de uma forma geral, e que tornam essas espécies mais suscetíveis aos impactos ambientais causados pelo homem

em seus habitats. Além disso, os potamotrigonídeos vivem em ambiente de água doce, mais restrito espacialmente que o ambiente marinho, o que limita suas oportunidades de evadir dos impactos antrópicos, como poluição das águas, destruição de habitats ou pesca (Compagno & Cook, 1995). Concomitantemente, os ambientes de água doce apresentam parâmetros ambientais muito mais variáveis que os ambientes marinhos, com flutuações freqüentes no pH, temperatura, quantidade de oxigênio solubilizado, nível da água e outros parâmetros. Essas variações ambientais podem ser alteradas de forma mais acentuada pela ação humana nos ambientes de água doce, podendo exceder as adaptações morfológicas e fisiológicas dos potamotrigonídeos, que provavelmente são mais suscetíveis à extinção que outros peixes de água doce (Compagno & Cook, 1995). Os impactos antrópicos identificados exercidos sobre populações de potamotrigonídeos são: a pesca de subsistência; pesca artesanal com propósito ornamental; *bycatch* de pesca comercial; pesca recreativa; pesca negativa (eliminação devido periculosidade do ferrão) promovida por hotéis de turismo e deterioração e destruição de habitats (dragagem, represamentos e minas de ouro) (Araújo, 1998), e recentemente a pesca comercial passou a ter mais importância para a espécie *Paratrygon aiereba* no estado do Pará (Charvet-Almeida, com. pessoal). As arraias-de-água-doce apresentam ferrão venenoso e ferroam quando pisadas, causando ferida muito dolorosa e por isso são muito temidas pelos ribeirinhos. Assim, elas geralmente são mortas ou têm a ponta de suas caudas extirpadas nos arredores das comunidades ribeirinhas. Por esse mesmo motivo, em um período de três anos, cerca de 21.000 arraias foram mortas nos arredores da cidade de Manaus – AM, a mando da indústria de turismo para manter praias livres para usufruto de seus clientes (Charvet-Almeida *et al.*, 2002).

Nos últimos 15 anos a pesca para exportação vem crescendo continuamente, perfazendo atualmente cerca de 1% dos peixes ornamentais exportados a partir de Manaus (Charvet-Almeida *et al.*, 2002). Entretanto, em portaria recente, o IBAMA proibiu a captura, transporte e comercialização de arraias para fins de ornamentação (portaria 118, de 19/09/2006.. A pesca das arraias para exportação concentra-se basicamente nas cercanias da cidade de Barcelos, no Rio Negro (Charvet-Almeida *et al.*, 2002), mas também ocorre nos rios Tapajós, Xingu, Tocantins e provavelmente rio Paraguai (obs. pess.).

CAPÍTULO 1

Sistemática filogenética e biogeografia da família Potamotrygonidae

1.1 INTRODUÇÃO

A família de arraias-de-água-doce Potamotrygonidae Garman, 1877 é um grupo monofilético (Rosa, 1985b; Lovejoy *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2004b) pertencente à ordem Myliobatiformes (araias-com-ferrão). O provável clado-irmão do grupo, (*Himantura schmardae* + *Himantura pacifica*) (Lovejoy, 1996; Lovejoy *et al.*, 1998) ocorre nos mares do caribe, o que fez com que Lovejoy *et al.* (1998), baseado em estudo de filogenia e relógio molecular (gene mitocondrial citocromo *b*), propusesse que o ancestral comum da família Potamotrygonidae tenha invadido águas continentais a partir do noroeste da América do Sul entre 15 e 23 milhões de anos atrás, período em que ocorreram transgressões marinhas na América do Sul. Marques (2000), também baseado em filogenia e relógio molecular, estimou a origem do ancestral da família em cerca de 19 milhões de anos, com limite de confiança entre 6-38 milhões de anos atrás, data compatível com Lovejoy *et al.* (1998). Provavelmente outros grupos marinhos também tenham se adaptado aos ambientes de água doce da América do Sul a partir dessas transgressões (Lovejoy *et al.*, 1998; Lundberg *et al.*, 1998). Entretanto, Carvalho *et al.* (2004a) hipotetizou que o ancestral da família Potamotrygonidae surgiu a não menos que 50 milhões de anos atrás. Sua hipótese biogeográfica para a origem da família foi baseada em filogenia usando caracteres morfológicos e calibração das idades a partir de fósseis de arraias da ordem Myliobatiformes. Porém a topologia da sua árvore filogenética é suportada por poucos caracteres sinapomórficos e difere substancialmente de outras propostas para o grupo (Nishida, 1990; Lovejoy, 1996;

McEachran *et al.*, 1996) as quais não são conflitantes com a relação (*Himantura pacifica* + *H. schmardae* (Potamotrygonidae)), resultado esse que levou a não utilização da sua data proposta para a origem da família Potamotrygonidae nas análises dessa dissertação. De qualquer maneira, a partir da adaptação do ancestral da família à vida em ambientes de água doce, houve extensiva especiação dentro dessa família. A família Potamotrygonidae como reconhecida hoje é composta por três gêneros, *Paratrygon* Duméril, 1865, *Plesiotrygon* Rosa, Castello & Thorson, 1987 e *Potamotrygon* Garman, 1877. Os dois primeiros gêneros são considerados monotípicos enquanto que *Potamotrygon* contém 16 (Carvalho *et al.*, 2003) a 18 (Rosa, 1985b) espécies consideradas taxonomicamente válidas. Entretanto, a taxonomia da família não é bem resolvida contendo várias espécies taxonomicamente dúbias, e pelo menos cinco espécies não descritas (Carvalho *et al.*, 2003). As arraias da família Potamotrygonidae despertaram interesse dos naturalistas europeus desde o período colonial, pela singularidade de viverem em água doce (Castex *et al.*, 1963 e referências). Houve uma retomada dos trabalhos taxonômicos da família nas décadas de 60 e 70. Esses estudos foram baseados em poucos indivíduos (e.g. Castex *et al.*, 1963; Castex, 1964; Achenbach & Achenbach, 1976) e não compreenderam a variação fenotípica observada na natureza. Rosa (1985b) proveu a primeira revisão taxonômica da família e gerou a primeira hipótese filogenética no nível genérico. Em seu estudo, *Plesiotrygon iwamae* aparece como espécie irmã das demais da família e *Paratrygon aiereba* e as espécies do gênero *Potamotrygon* aparecem como grupos irmãos. Lovejoy (1996), Lovejoy *et al.* (1998) e Carvalho *et al.* (2004b) sugerem que *Plesiotrygon iwamae* seja a espécie irmã do gênero *Potamotrygon* com *P. aiereba* basal na família. Marques (2000) sugere que *Paratrygon aiereba* é a espécie basal da família; o gênero *Potamotrygon* é parafilético em relação à *P. iwamae*, espécie que compartilha ancestral comum mais recente com

Potamotrygon yepezi e *Potamotryon* sp. do rio Negro; e que um grupo monofilético de 10 espécies do gênero *Potamotrygon* tenha se originado há 2,5 milhões de anos atrás, idade relativamente recente no tempo evolutivo.

Rosa (1985b) produziu uma chave de identificação para as espécies da família baseada principalmente em padrões de cor, embora o seu estudo tenha se pautado principalmente pela utilização de espécimes depositados em museus. Na década de 90, alguns grupos de pesquisadores começaram estudos de campo e formação de coleções na Bacia Amazônica focando particularmente o rio Negro (Araújo, 1998); rio Amazonas, especialmente na porção média e baixa (Charvet-Almeida, 2001; Almeida, 2003); rio Xingu (Charvet-Almeida, 2006) e rio Tocantins (Rincon, 2006). Esses estudos resultaram na descoberta de novas espécies e prováveis novas espécies, mas também demonstraram a existência de elevado grau de policromatismo em algumas espécies, demonstrando a dificuldade em se delimitar espécies usando a chave proposta por Rosa (1985b). Um alto grau de policromatismo foi observado particularmente em *Potamotrygon motoro* e *P. orbignyi* no rio Negro (Araújo, com. pessoal, obs. pessoal), *P. motoro* no rio Amazonas (Charvet-Almeida & Almeida, 2004); *P. scobina* na foz do rio Amazonas (Almeida, 2003), e *P. orbignyi* rio Paranã-Tocantins (Rincon, 2006) e rio Xingu (Charvet-Almeida, 2006).

No presente estudo, foram geradas hipóteses filogenéticas baseadas em segmento de dois genes mitocondriais, os genes ATP sintetase subunidades 6 e 8, e Citocromo *c* oxidase I (COI), com representantes de nove das 18-20 espécies válidas e duas não-descritas da família Potamotrygonidae; foi estimada a idade dos principais eventos de especiação dentre as espécies estudadas; e, a partir dos resultados obtidos, foi discutido a origem do grupo de espécies aqui denominado “roseta-ocelado”.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1. *Objetivo Geral*

Discutir a história evolutiva do gênero *Potamotrygon* em função das relações filogenéticas propostas e a geografia.

1.2.2. *Objetivos Especificos*

- Sequenciar segmento dos genes mitocondriais COI e ATPase subunidades 6 e 8.
- Gerar hipóteses das relações filogenéticas entre as espécies da família Potamotrygonidae
- Estimar o tempo de divergência das principais linhagens baseado em relógio molecular
- Propor hipótese da história evolutiva do gênero *Potamotrygon* baseada nas relações filogenéticas encontradas e na distribuição geográfica das espécies do gênero.

1.3. MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Amostragem

Foram amostrados 1cm³ de tecido muscular da parte ventral dos espécimes coletados, que foi armazenado imediatamente em álcool a 95%. Os espécimens tombados em coleções estão listados no Anexo I As espécies amostradas foram *Paratrygon aiereba*, *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon falkneri*, *P. leopold*, *P. motoro*, *P. orbigny*, *P. scobina*, *P. schroederi*, *Potamotrygon* sp. aff. *scobina*, *Potamotrygon* sp. aff. *schroederi*, *Potamotrygon* sp.1, e *Potamotrygon* sp.2. (Anexo I, Fig. 1). A espécie *P. falkneri* foi coletada no lago da represa de Jupia, na cidade de Três Lagoas, Mato Grosso do Sul. Essa drenagem faz parte da bacia do rio Paraná superior que não é local de ocorrência histórica de potamotrigonídeos. Entretanto, desde a construção da usina hidrelétrica de Itaipu vem sendo registrado ocorrências de arraias na bacia superior do rio Paraná (Junior, 2005). Foram obtidas amostras de espécimes coletados na bacia do rio Orinoco, Venezuela, que foram identificados apenas por fotografia (Anexo III). Esses espécimes foram classificados em três espécies, *Potamotrygon* sp. aff. *scobina* e *Potamotrygon motoro*, a partir do padrão de cor, e *Potamotrygon* sp. aff. *schroederi* pela proximidade genética encontrada com *P. schroederi* do rio Negro e porque essa espécie foi descrita originalmente para o rio Orinoco. *Potamotrygon* sp.1 é endêmica do rio Negro, Bacia Amazônica e é bem caracterizada tanto morfológica quanto ecologicamente (Araújo, 1998), mas ainda não foi descrita cientificamente. *Potamotrygon* sp.2 apresenta um padrão de cor relativamente semelhante à *P. motoro* porém característico e apresenta distribuição restrita à montante das cachoeiras do rio Tapajós.

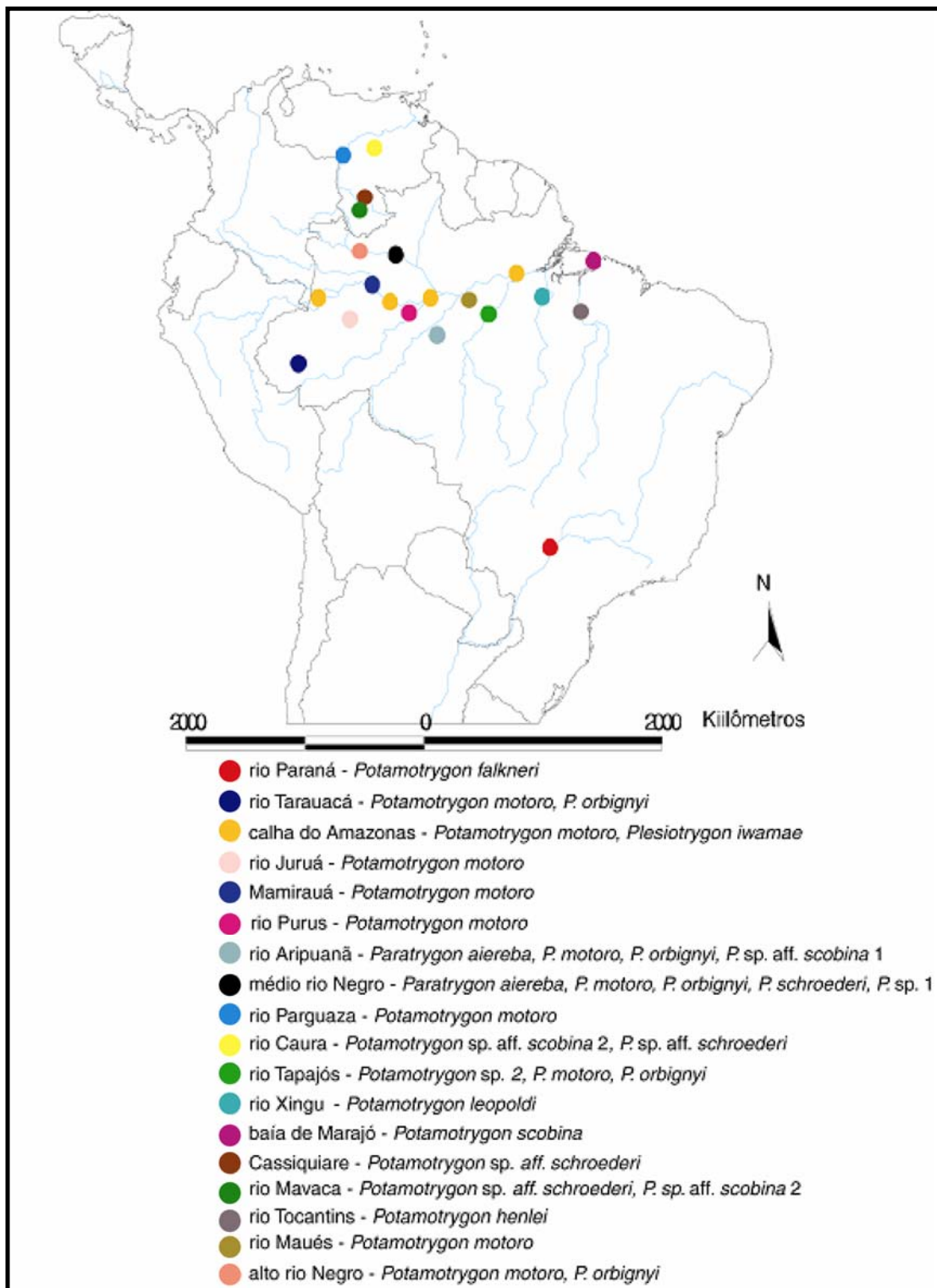


Figura 1. Localização geográfica das amostras de cada espécie analisadas nesse estudo.

Na análise filogenética também foram incluídas seqüências do gene mitocondrial COI de *P. henlei* e *Plesiotrygon iwamae* obtidas de Marques (2000). Como grupo externo foram incluídos o tubarão *Heterodontus francisci* e as espécies de arraia-de-ferrão da ordem Myliobatiformes *Hexatrygon bickelli* e *Himantura pacifica*. Seqüências de *Heterodontus francisci* e *Hexatrygon bickelli* foram obtidas do GenBank. Seqüência de *Himantura pacifica* foi obtida Marques (2000). O gênero *Himantura* é considerado o taxon irmão mais provável de Potamotrygonidae (McEachran *et al.*, 1996; Lovejoy *et al.*, 1998; Dunn *et al.*, 2003 mas ver Carvalho *et al.*, 2004).

1.3.2 Extração de DNA, amplificação e seqüenciamento

Os DNA genômico e mitocondrial totais foram extraídos de tecido muscular preservado em álcool pelo protocolo padrão de Sambrook *et al.* (1989). Foi amplificado o gene mitocondrial COI pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* COIf 5'–CTGCAGGAGGAGAYCC–3' (*forward*) e COIa 5'–AGTATAAGCGTCTGG GTAGTC–3' (*reverse*) descrito por Palumbi and Benzie (1991). Foi amplificado o gene mitocondrial ATPase, subunidades 6 e 8, com os *primers* PotaATPf2_Lys 5'–GGGTCYAGCATTAGCCTTT–3' (*forward*) e PotaATPr2 5'–GTTAGTGGTCAGGG GCTTGG–3' (*reverse*) desenvolvidos para este trabalho (Toffoli *et al.*, 2006). Os PCRs foram realizadas em um volume de reação de 25 µl, contendo 2,5µl de dNTPs (10 mM); 2,5µl de tampão 10X (100mMTris-HCL, 500mM KCl); 2µl de cada *primer* (2µM), 3µl de MgCl₂ (25mM); 1µl de DNA (ca. 10ng) e 1U da DNA polimerase *Taq*. Os ciclos de amplificação foram realizados como segue: 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto; anelamento a 52 °C por 35 segundos; e extensão a 72 °C por 90 segundos. Uma extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos. O produto de PCR foi visualizado em

gel de agarose a 1%. O produto de PCR foi purificado com o kit *GFX™ PCR DNA Kit* (Amersham Bioscience), e diluído em 20µl de tampão de diluição. O *primer forward* usado na amplificação do gene COI também foi usado na reação de seqüenciamento, enquanto que o *primer reverso* PotaATP.r 5'-AGTRGKGTTGGTGTTCCTTCTGG-3' (*reverse*), desenvolvido para este trabalho (Toffoli *et al.*, 2006), foi usado na reação de seqüenciamento do genes ATPase6/8. Os ciclos da reação de seqüenciamento foram realizados a 52 °C seguindo protocolo recomendado pelo fabricante do kit *ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Bioscience). Os ciclos de reação de seqüenciamento foram realizados num volume final de 10µl contendo 4µl de DNA, 2µl de *primer* a 0,2µM; 2µl de tampão suprido pelo kit *ET* e 2µl do *mix ET*. Os produtos amplificados do ciclo de seqüência foram precipitados usando a precipitação padrão por acetato de amônio/etanol. Posteriormente esses produtos foram ressuspensos em formamida e as seqüências lidas no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE-Healthcare).

1.3.3 Alinhamento Filogenético

As seqüências foram alinhadas no programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1996) usando as configurações padrão e editadas a olho. Clustal W é implementado no programa BioEdit (Hall, 1999). Sítios variáveis foram checados no programa MEGA 3.0 (Kumar *et al.*, 2004) e o alinhamento completo foi traduzido em aminoácidos hipotéticos para verificar códons de parada inesperados. Tanto o segmento de 522 pares de base do gene COI como o segmento de 500 pares de base dos genes ATPase6/8 não resultaram em nenhum códon de parada inesperado. O fragmento gênico ATPase6/8

apresentou a deleção/inserção de um aminoácido na posição 57 do segmento seqüenciado.

1.3.4 Análise filogenética

Para a construção das hipóteses filogenéticas baseadas no gene mitocondrial COI foram utilizadas todas as seqüências geradas nesse estudo, enquanto que somente os haplótipos foram utilizados nas hipóteses baseadas nos genes ATPase6/8 e análise combinada dos dois genes (ANEXO I). Os haplótipos de ATPase6/8 foram obtidos no programa Collapse 1.2 (disponível na web darwin.uvigo.es). Como os genes da mitocôndria são ligados, as seqüências de COI e ATPase6/8 foram combinadas para gerar hipótese filogenética baseada em um maior número de sítios informativos. Para espécies que não tiveram um mesmo indivíduo seqüenciado para os dois genes, foram concatenadas seqüências de dois indivíduos diferentes (*Plesiotrygon iwamae*, indivíduo 462 e seqüência obtida de Marques (2000) para o gene COI; *Potamotrygon* sp.2, indivíduos 167 e 485; e *P. sp. aff. shcroederei*, indivíduos 155 e 374). O gene COI não foi seqüenciado para *Paratrygon aiereba* e os genes ATPase6/8 não foram seqüenciados para *Himantura pacifica*.

As relações filogenéticas reconstruídas sob o critério ótimo de Máxima Parcimônia (MP); *Neighbor-Joining* (NJ); e Máxima Verossimilhança (MV) foram realizadas no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002), enquanto que análises sob o critério *Bayesian-likelihood* (BL) foram realizadas no programa MrBayes 3.01 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

As relações filogenéticas baseadas em MP foram reconstruídas por meio de 25 buscas heurísticas usando adição aleatória das seqüências, e implementando o algoritmo

tree bisection and reconnection (TBR). A robustez da topologia MP foi testada usando 1000 replicatas de *bootstrap*.

Foi usado o programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) para determinar o melhor modelo de evolução molecular das seqüências. Para o gene COI foi determinado o modelo *General Time Reversible* (GTR) (Rodríguez *et al.*, 1990) com homogeneidade de taxas de substituição, com uma fração dos sítios tratada como invariável. Para os genes ATPase6/8 foi determinado o modelo *Transition Model* (TIM), com distribuição gama e com uma fração dos sítios tratadas como invariável. Para os gene combinados COI e ATPase6/8 foi determinado o modelo *Transversional Model* com distribuição gama e com uma porção dos sítios tratadas como invariável TVM+ I + G. O modelo de evolução de seqüência GTR + inv foi implementando nas análises de NJ, MV e BL do gene COI, enquanto que o modelo TIM+I+G foi implementando nas análises de NJ, MV e BL dos genes ATPase6/8 e o modelo TVM+ I + G foi implementando nas análises de MP, NJ e BL nos dados combinados.

As relações filogenéticas baseadas em NJ foram estimadas utilizando-se o modelo de evolução escolhido pelo programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) sob as especificações de máxima verossimilhança. A robustez da topologia NJ foi testada usando 1000 réplicas de *bootstrap*.

As relações filogenéticas baseadas em MV foram estimadas por meio de 25 buscas heurísticas usando adição aleatória das seqüências, e implementando o algoritmo *tree bisection and reconnection* (TBR) sob o modelo de evolução mencionado acima e determinado pelo programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998).

As relações filogenéticas baseadas em BL foram estimadas por meio de busca heurística completa do espaço das árvores. Os dados foram repartidos em seis classes (ATPase6/8, COI, e posições das bases 1, 2 e 3. Foi utilizado o modelo evolução

escolhido pelo programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998). Foram corridas 5.000.000 de gerações, e árvores e comprimento dos ramos foram amostrados a cada 100 gerações. Uma vez que os valores de *likelihoods* estabilizaram-se dentro das 500.000 primeiras corridas, foram descartadas as primeiras árvores representando 10% do total para a computação da árvore consenso sob o critério de 50% da maioria. A porcentagem de vezes que um clado ocorreu entre as árvores amostradas foi interpretada como a probabilidade da existência desse clado, seguindo Huelsenbeck e Ronquist (2001). Essas são probabilidades verdadeiras sob o modelo de evolução assumido (Rannala & Yang, 1996) e portanto cladogramas com probabilidade Bayesiana posterior superior a 95% foram considerado significativamente suportados.

Estimativa de tempos de divergência dos nós da família Potamotrygonidae foi estimada no programa r8s (Sanderson, 1997) usando a abordagem *likelihood* penalizada semi-paramétrica de estimativa de tempos de divergência. As estimativas foram calculadas a partir da árvore MV com dados combinados de ATPase6/8 e COI. Com os dados de Lovejoy (1998), a filogenia foi restrita no nó de divergência entre Potamotrygonidae e *Himantura* usando o limite superior de idade, estimado em 23 milhões de anos. Usando os dados de Marques (2000), a filogenia foi restrita em dois pontos, 18,48 milhões de anos para a divergência entre Potamotrygonidae e *Himantura* e 11,49 milhões de anos para a divergência entre *Paratrygon* e todos os outros potamotrygonídeos. Essas estimativas foram realizadas por meio da contagem dos eventos mínimos e máximos de transverão nas terceiras posições de códon (de acordo com os dados de Marques (2000)) acumuladas do ponto de divergência entre os táxons até as pontas da árvore filogenética. Posteriormente foi feito uma média desses eventos de transverão, valor que foi convertido em anos, de acordo com a calibração de relógio molecular de 0,798 transverões na terceira posição do códon / milhões de anos

estimada por Marques (2000). O relógio molecular estimado por Marques (2000) foi calibrado com as idades de fechamento do Istmo do Panamá (6 milhões de anos), que provavelmente serviu de evento vicariante para as espécies *Himantura pacífica* e *H. schmardae* e; o isolamento do lago Maracaibo (8 milhões de anos) que deu origem à espécie *Potamotrygon yepezi*. Lovejoy (1998) calibrou também com o isolamento do Maracaibo.

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Análise filogenética

O alinhamento das seqüências de COI compreendeu 522 sítios dos quais 180 foram variáveis e 121 foram informativos para parcimônia. Dentro de Potamotrygonidade, o conjunto de dados de COI compreendeu 111 sítios variáveis e 79 sítios foram informativos para parcimônia. O alinhamento das seqüências de ATPase6/8 compreendeu 500 sítios dos quais 196 foram variáveis e 122 foram informativos para parcimônia. Dentro de Potamotrygonidade, o conjunto de dados compreendeu 137 sítios variáveis e 105 sítios foram informativos para parcimônia.

Todas as análises de BL, MV, MP e NJ indicaram que a família Potamotrygonidae é monofilética (Figs. 2-13). *Paratrygon aiereba* foi confirmada como espécie mais basal da família em todas as análises, em acordo com Lovejoy (1996), Lovejoy *et al.* (1998), Marques (2000) e Carvalho *et al.* (2004b), com exceção da árvore NJ com dados combinados de ATPase e COI. O posicionamento anômalo de *Paratrygon* na análise NJ com dados combinados, provavelmente deve-se a um artefato desse método, que é baseado em distância genética, e não corrige a ausência de

caracteres, como ocorreu no gene COI para essa espécie. A posição de *Plesiotrygon iwamae* na árvore filogenética variou de acordo com o método de reconstrução e com a base dados, mas geralmente apresentando baixo suporte estatístico (Figs. 2-13).

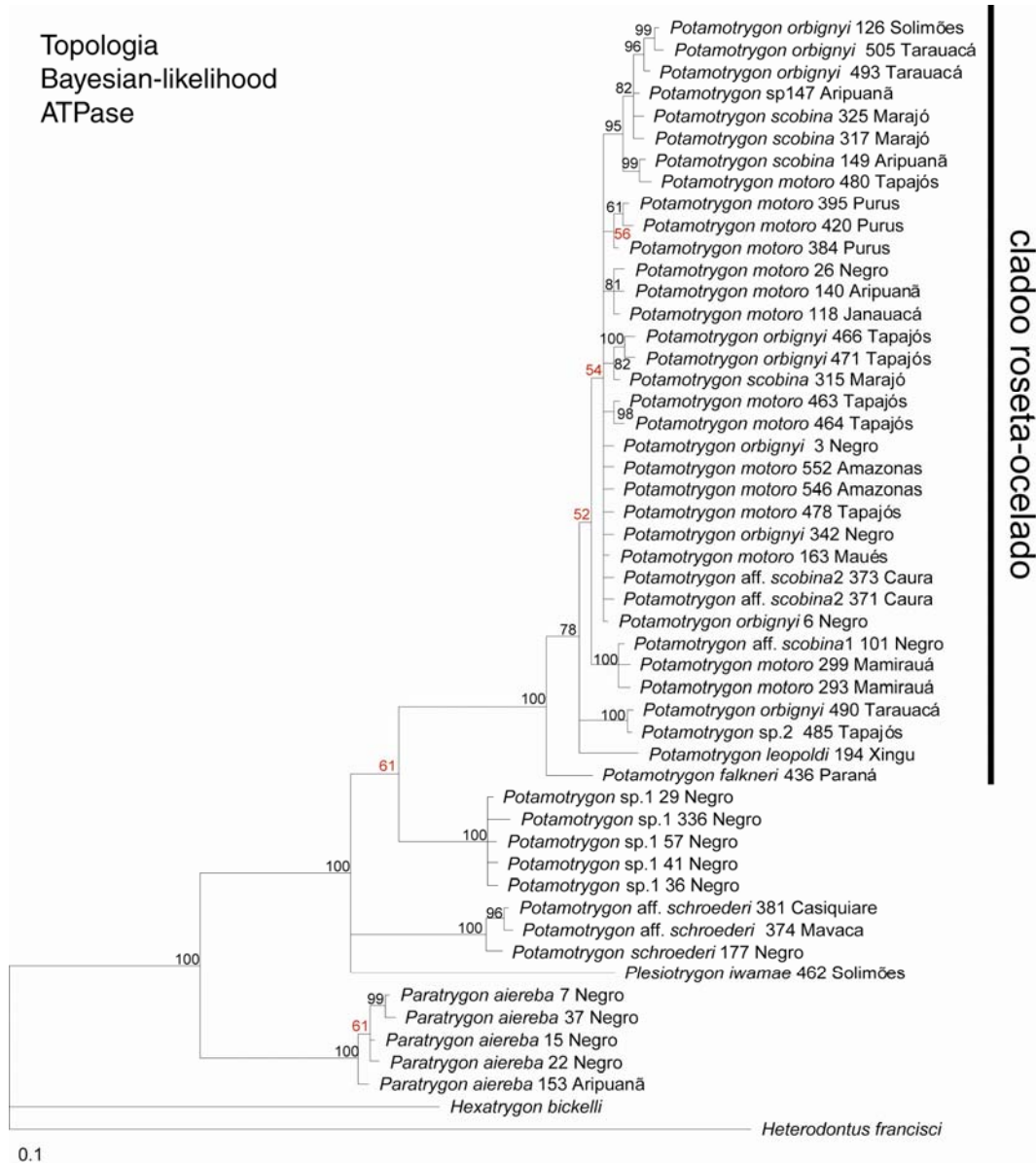


Figura 2. Árvore filogenética ATPase 6/8 – Análise Bayesiana

Topologia
Máxima Verossimelhança
ATP



Figura 3. Árvore filogenética ATPase 6/8 – Análise Máxima Verossimelhança

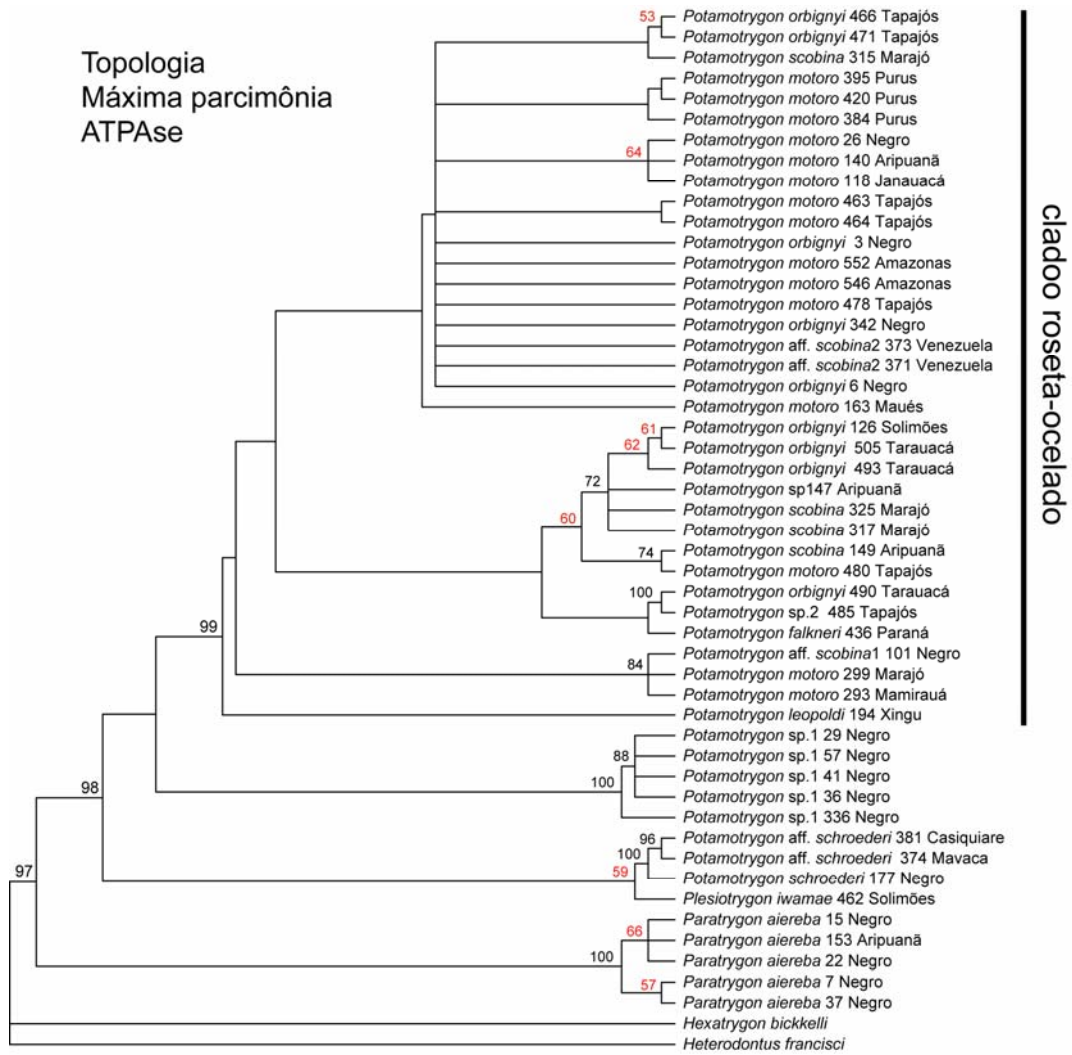


Figura 4. Árvore filogenética ATPase 6/8 – Análise Máxima Parcimônia

Topologia
Neighbor-Joining
ATPase

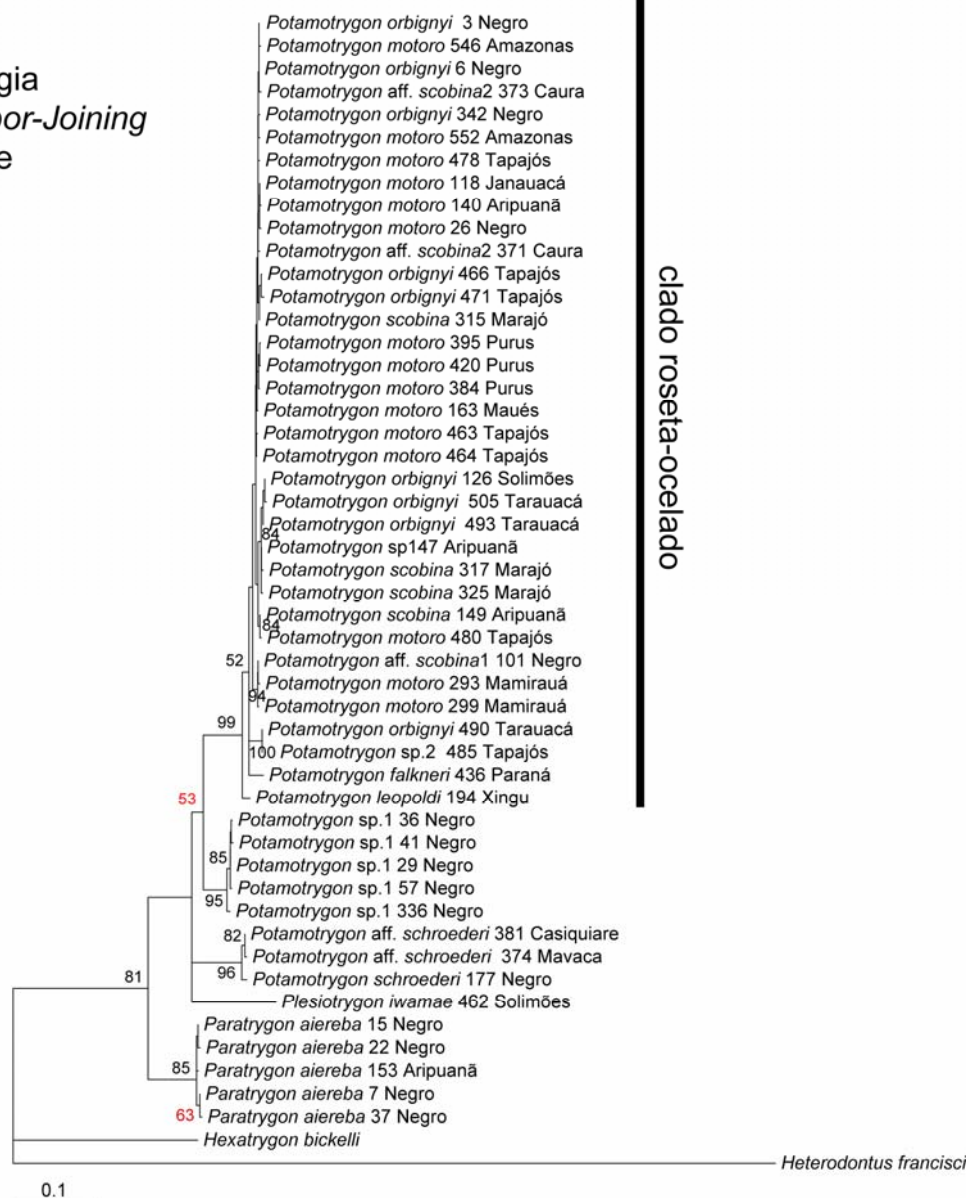


Figura 5. Árvore filogenética ATPase 6/8 – Análise Neighbor Joining

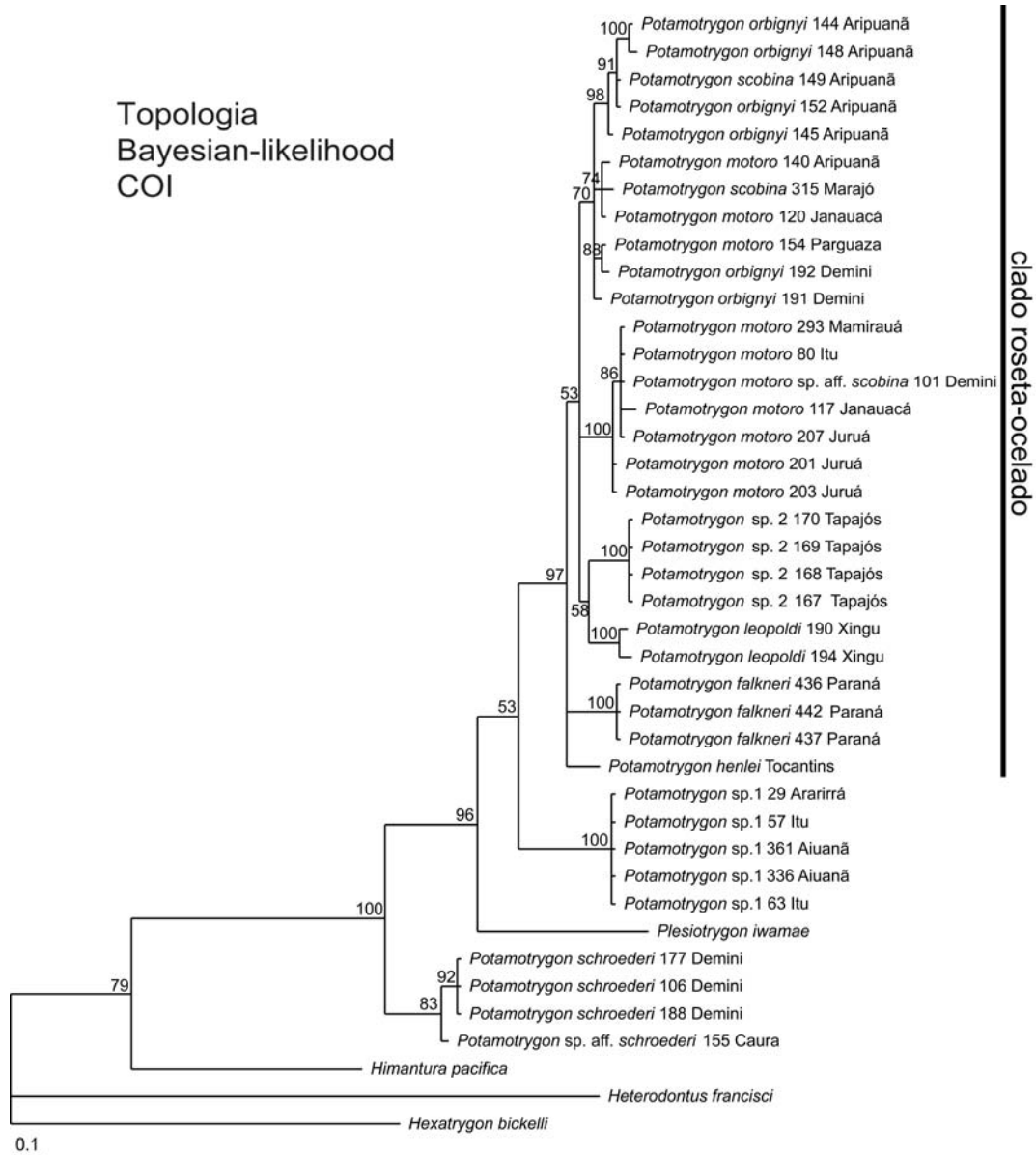


Figura 6. Árvore filogenética COI – Análise Bayesiana

Topologia
Máxima Versossimelhança
COI

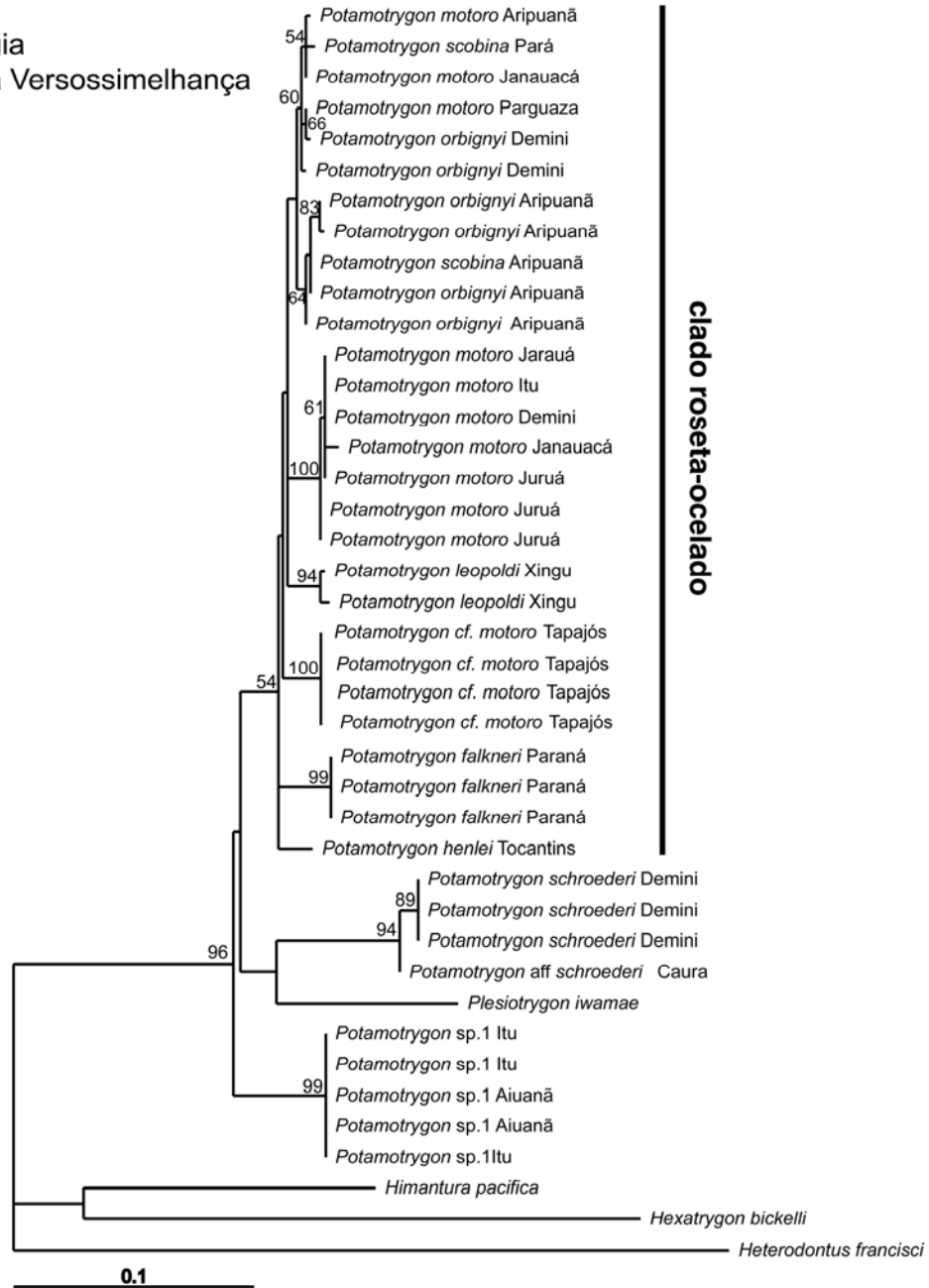


Figura 7. filogenética COI – Análise Máxima Verossimelhança

Topologia
Maxima Parcimonia
COI

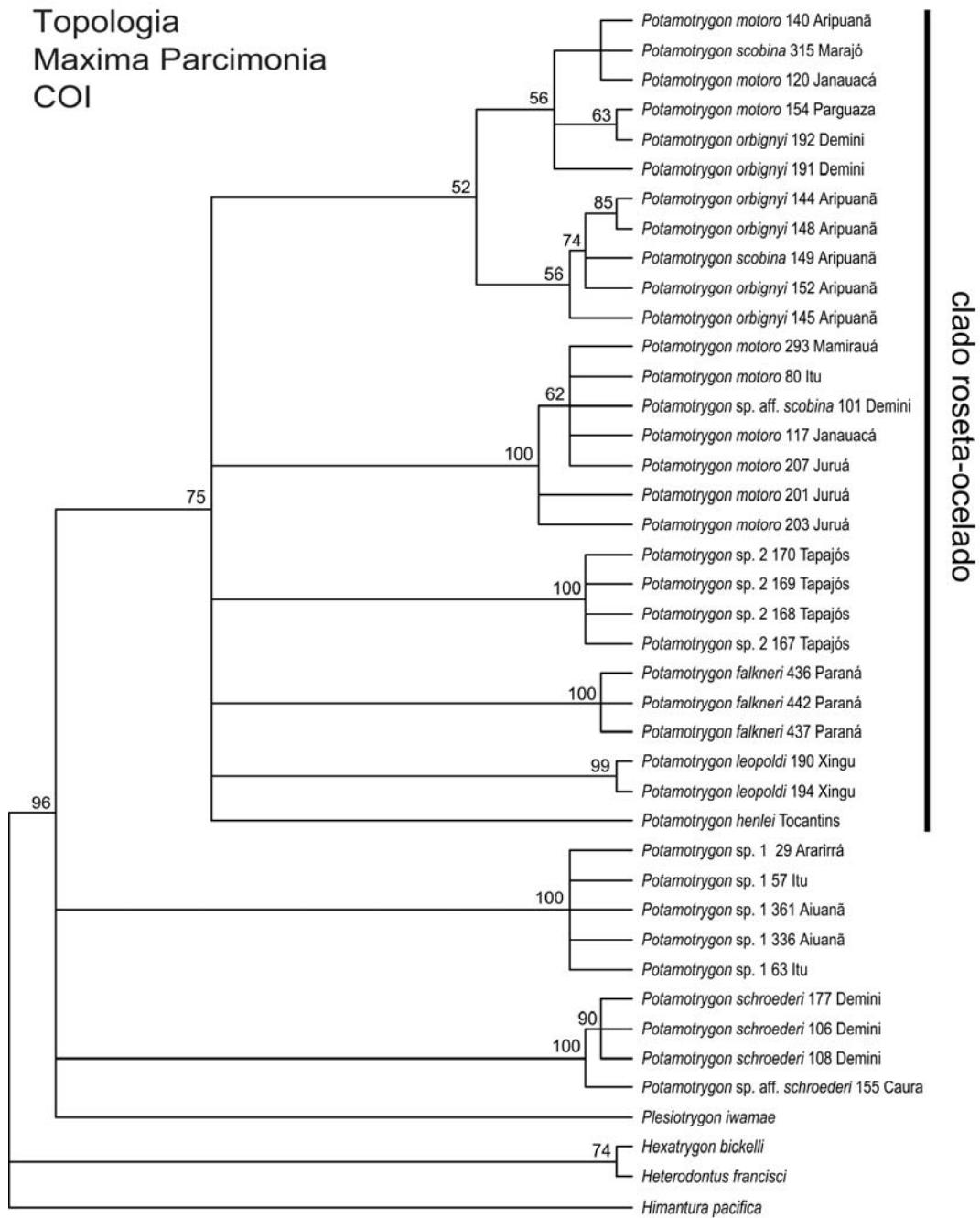


Figura 8. Árvore filogenética COI – Análise Máxima Parcimônia

Topologia
Neighbor Joining
COI

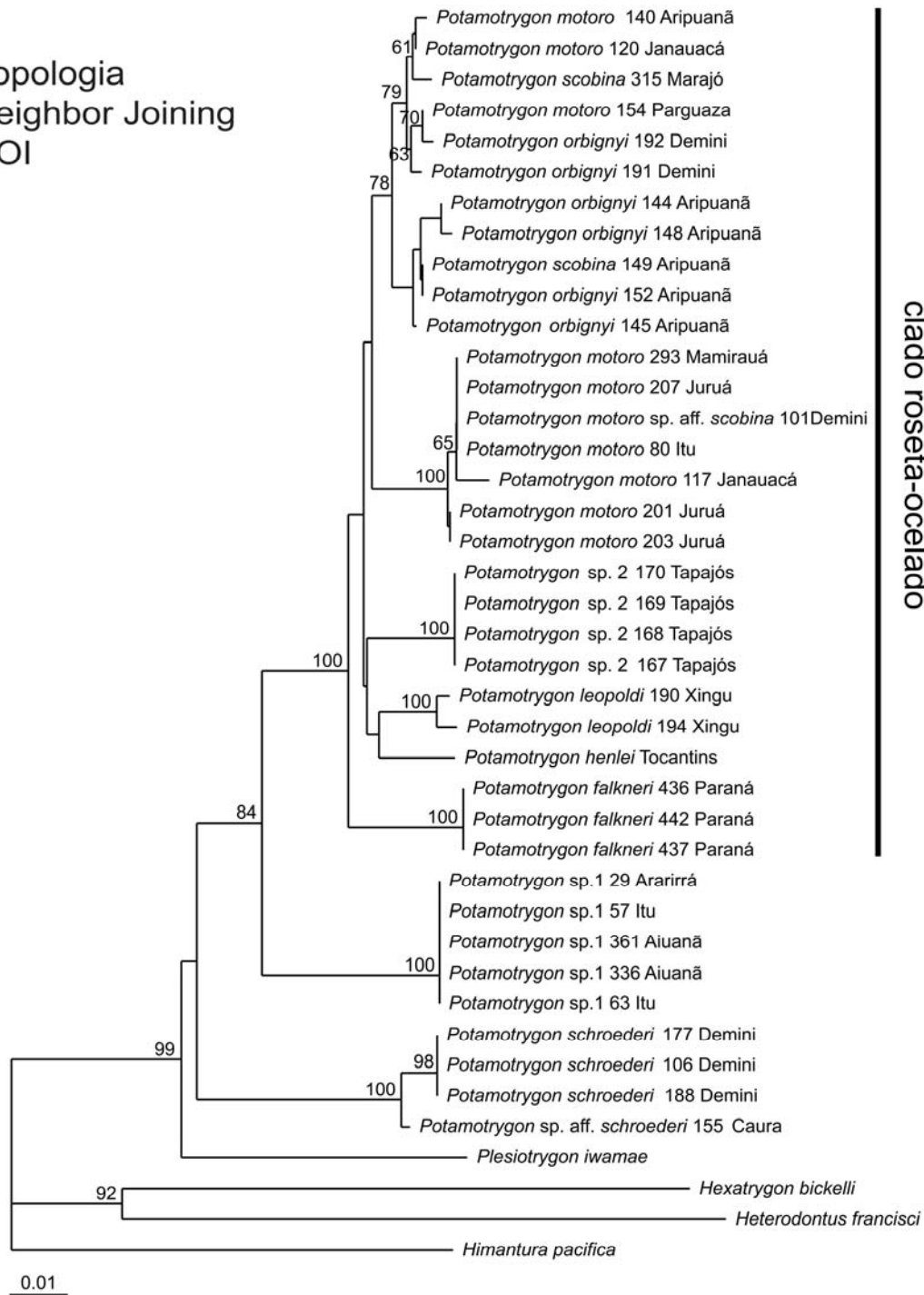


Figura 9. Árvore filogenética COI – Análise Neighbor Joining

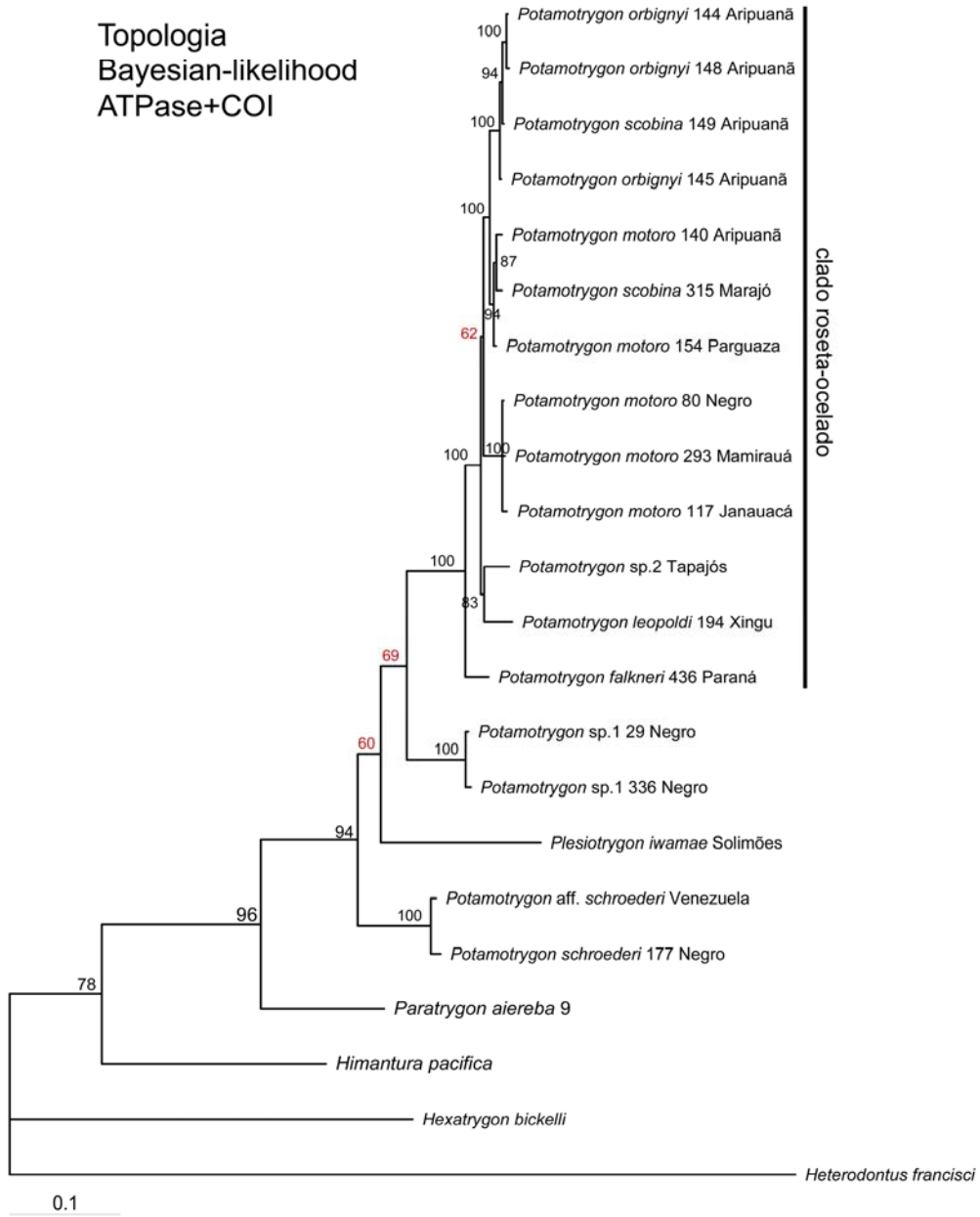


Figura 10. filogenética ATPase 6/8 + COI – Análise Bayesiana

Topologia
Máxima Verossimelhança
ATPase + COI

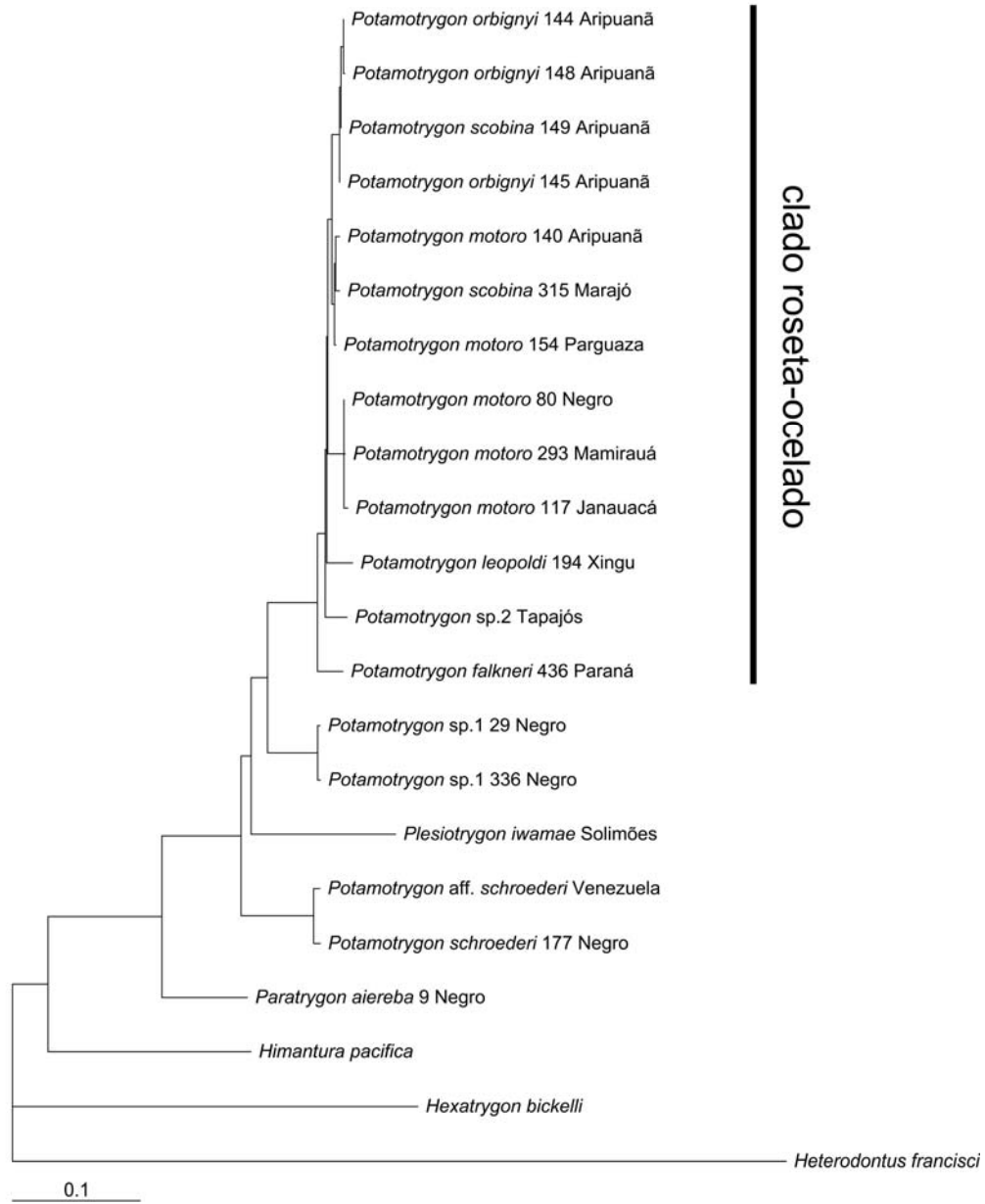


Figura 11. Árvore filogenética ATPase 6/8 + COI – Análise Máxima Verossimelhança

Topologia
Máxima Parcimônia
ATPase + COI

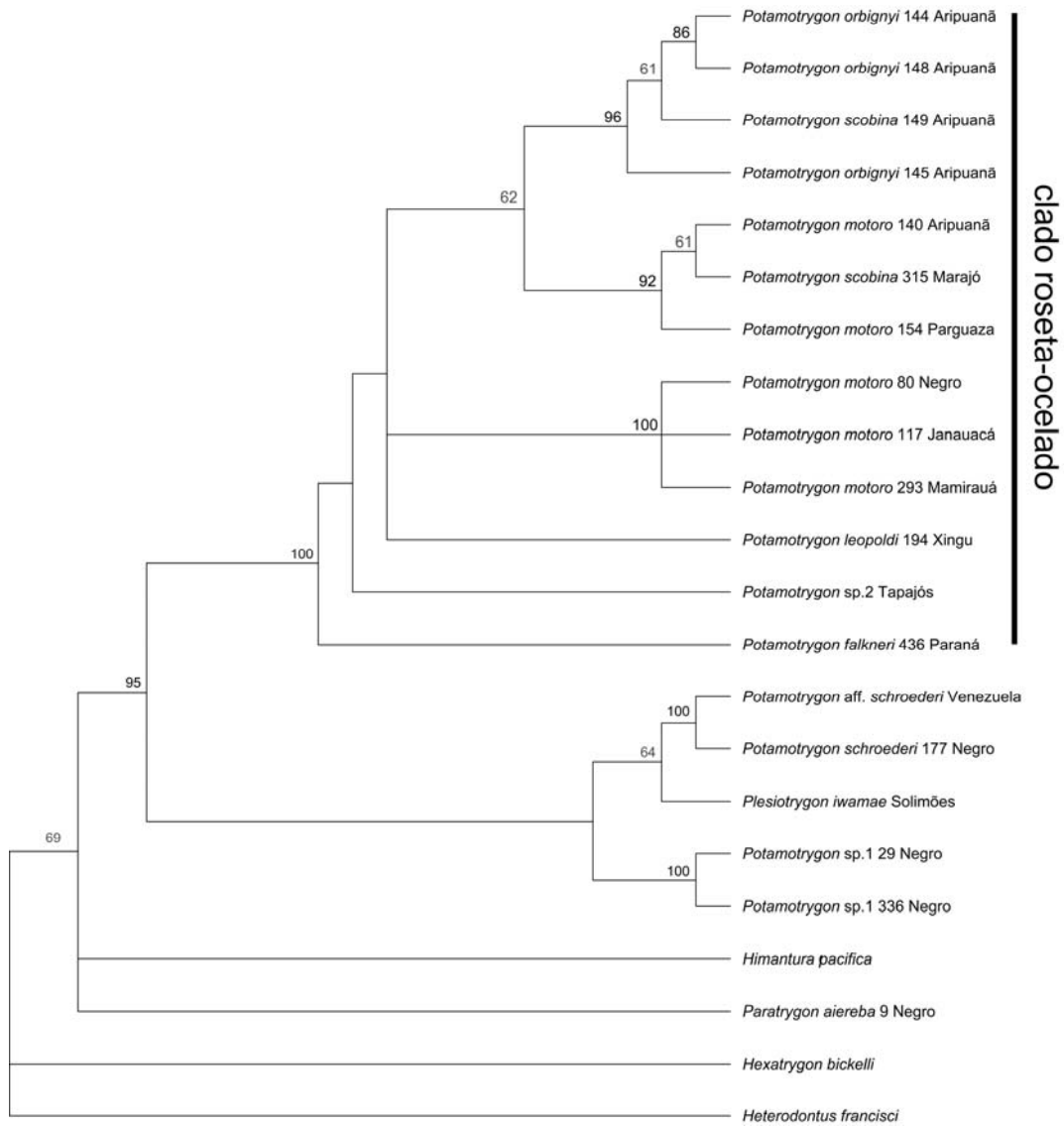


Figura 12 Árvore filogenética ATPase 6/8 + COI – Análise Máxima Parcimônia

Topologia
Neighbor Joining
ATPase + COI

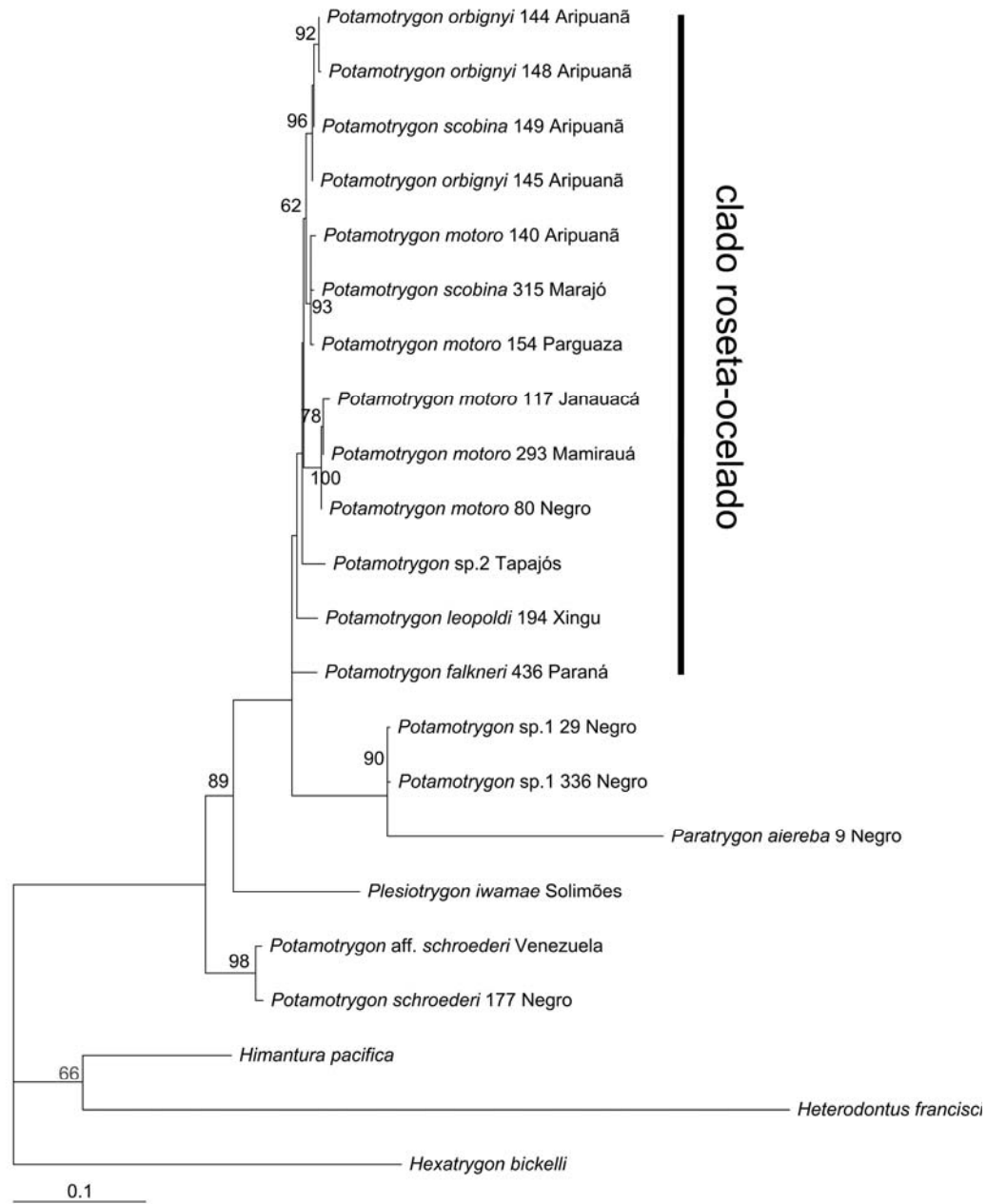


Figura 13. Árvore filogenética ATPase 6/8 + COI - Análise Neighbor Joining

Entretanto, a árvore BL com dados combinados apresenta alto suporte para *P. schroederi* como espécie basal de *Potamotrygon*, e *Plesiotrygon* agrupando dentro de *Potamotrygon*. E, apesar de não suportada estatisticamente, a relação (*Potamotrygon schroederi* (*Plesiotrygon* (*Potamotrygon* sp.1, grupo roseta-ocelado))), aparece nas reconstruções BL, MV e NJ com dados combinados, sugerindo que *Plesiotrygon* pode estar dentro do gênero *Potamotrygon*, uma vez que essas árvores apresentam maior número de caracteres e portanto provavelmente mais informativas.

A árvore não-enraizada, entretanto, sempre mantém a mesma topologia ((*Plesiotrygon iwamae* + *Potamotrygon schroederi*), (*Potamotrygon* sp.1 + grupo roseta-ocelado)) – Ver capítulo 3. O suporte do clado (*Potamotrygon* sp.1 + grupo roseta-ocelado) foi estatisticamente significativo somente para a árvore concatenada. Somente na árvore concatenada foi alto o suporte estatístico mostrando que *Potamotrygon falkneri* é grupo-irmão dos demais clados dentro do grupo roseta-ocelado. O monofiletismo da maioria das espécies analisadas obteve grande suporte estatístico, inclusive as duas espécies não-descritas *Potamotrygon* sp.1 e *Potamotrygon* sp.2. Entretanto, a relação filogenética reconstruída entre as espécies do grupo roseta-ocelado variou de acordo com o método de reconstrução, sempre com baixo suporte estatístico. As espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* compartilham haplótipos extensivamente, questão que será discutida no capítulo 2.

As idades de divergência das espécies, calibradas tanto com dados de Marques (2000) quanto Lovejoy *et al.* (1998), geraram estimativas aproximadas de idade. A diversificação do gênero *Potamotrygon*, incluindo *Plesiotrygon* foi de 7,68 e 6,77 milhões de anos atrás para as calibrações com os dados de Lovejoy *et al.* (1998) e Marques (2000), respectivamente (Tabela 1). A origem do grupo roseta-ocelado

ocorreu entre 2,04 e 1,79 de anos atrás para as calibrações com os dados de Lovejoy *et al.* (1998) e Marques (2000), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Tempo de divergência a partir de calibração com dados de Lovejoy *et al.* (1998) e Marques (2000).

	Lovejoy <i>et al.</i> Idade média (95% de intervalo de confiança)	Marques Idade média (95% de intervalo de confiança)
Radiação grupo roseta-ocelado	2,04 (1,32 – 3,28)	1,79 (1,18 – 2,65)
<i>Potamotrygon</i> sp. 1	5,64 (4,17 – 7,41)	4,95 (3,79 – 6,21)
<i>Plesiotrygon</i>	7,10 (5,59 – 8,95)	6,26 (5,15 – não-definido)
<i>Potamotrygon</i>	7,68 (6,1 – 9,57)	6,77 (5,61 – 7,93)
<i>P.sp. aff. schroederi</i>	0,58 – 0,63	0,50 – 0,56

Topologia
Máxima Verossimelhança
ATPase + COI

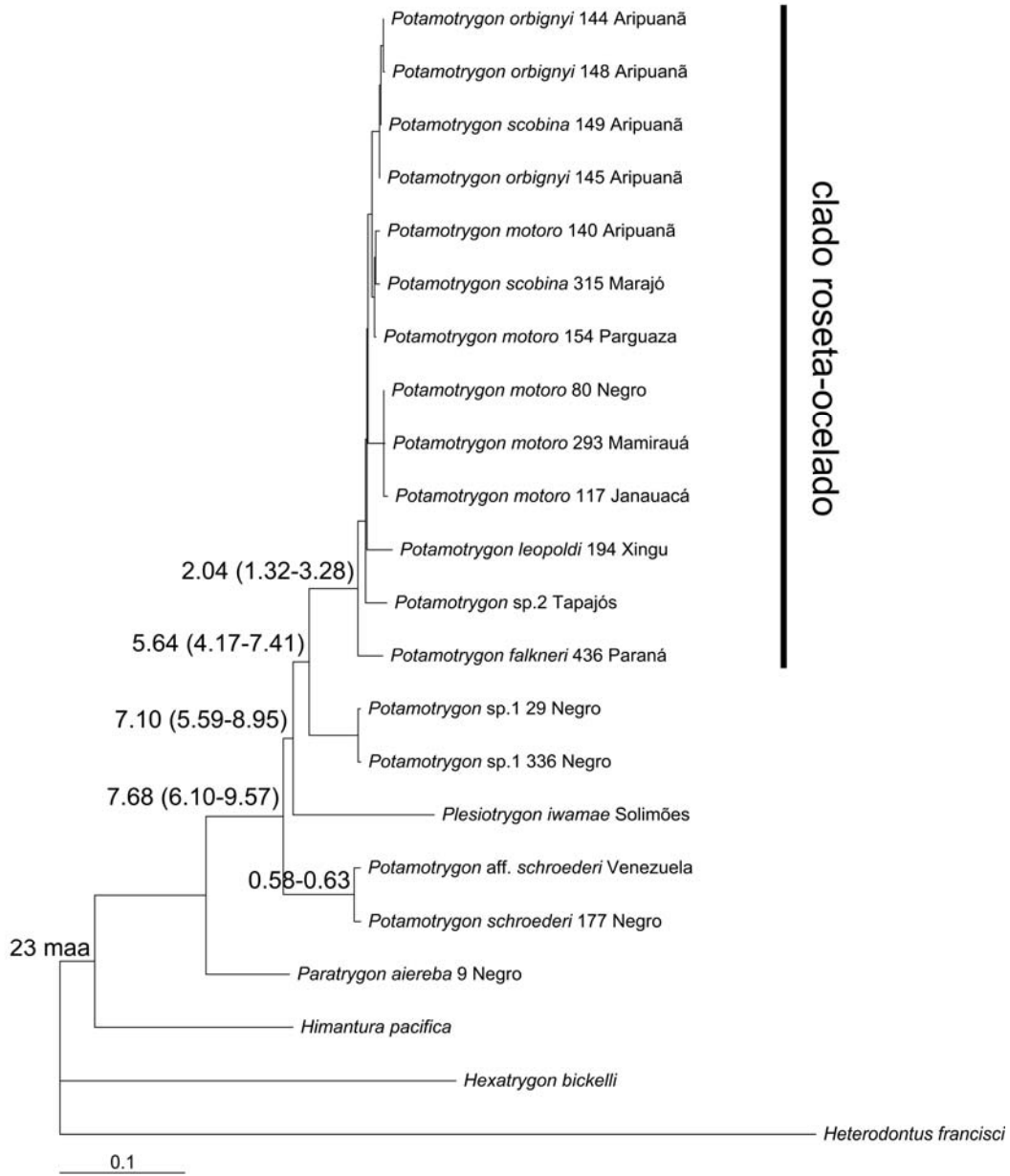


Figura 14. Árvore filogenética calibrada por dados de Lovejoy *et al.* (1998).

Topologia
Máxima Verossimelhança
ATPase + COI

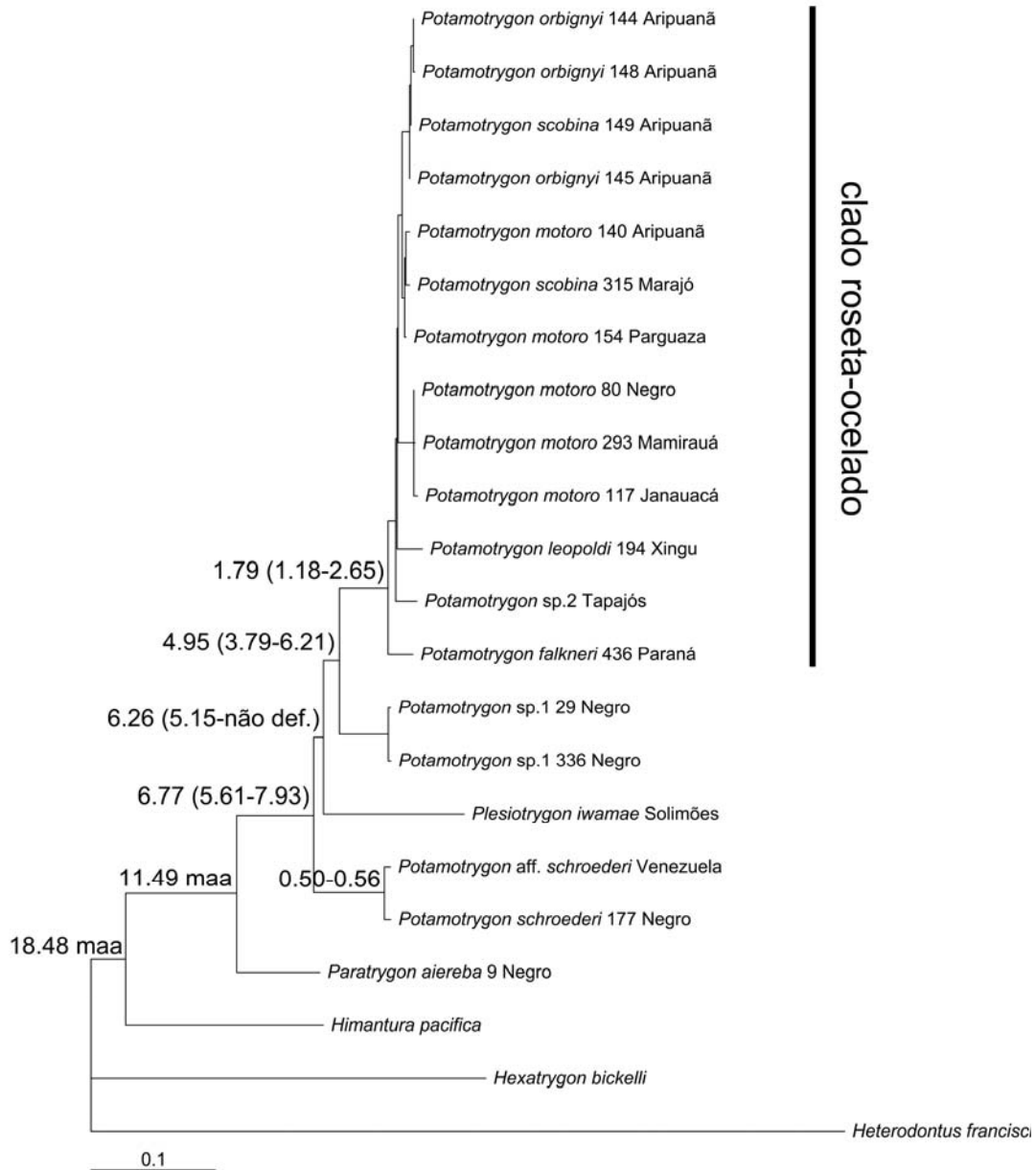


Figura 15. Árvore filogenética calibrada por dados de Marques (2000)

1.5 DISCUSSÃO

1.5.1 Filogenia da família Potamotrygonidae – “A Radiação”

Politomias encontradas em árvores filogenéticas podem ser classificadas em *soft polytomy* ou *hard polytomy*. *Soft polytomy* são aquelas que aparecem por falta de caracteres informativos suficientes na análise, mas que são resolvidas com a adição de mais caracteres. *Hard polytomy* ocorre quando eventos sucessivos ou simultâneos de especiação ocorrem em um grupo de forma muito rápida no tempo evolutivo, o que não permite acumulação de sinapomorfias que consigam resolver a relação entre as espécies (Maddison, 1989). A taxa de substituição de genes mitocondriais de cartilagosos é de sete a oito vezes mais lento que em primatas ou ungulados, provavelmente devido a menores taxas metabólicas (Martin *et al.*, 1992). Essa evolução lenta associada a eventos de especiação relativamente rápidos pode explicar o pequeno número de caracteres sinapomórficos que sustentem a relação entre as espécies (especiação entre *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon schroederi* e *P. sp.*, há cerca de 7 milhões de anos e especiação do grupo roseta ocelado, há cerca de 2 milhões de anos atrás, Tabela 1).

A análise filogenética com dados combinados de ATPase6/8 e COI apontam para a relação ((*Plesiotrygon iwamae* + *Potamotrygon schroederi*), (*Potamotrygon sp.1* + demais espécies *Potamotrygon*)) e a relação (*P. falkneri* + grupo roseta-ocelado), o que sugere que a adição de mais caracteres aumente a resolução das relações entre as espécies do grupo. Entretanto, o relativo pouco tempo evolutivo (aprox. 2,0 m.a., Tabela 1) para a origem de várias espécies do grupo roseta-ocelado (*Potamotrygon henlei*, *P. leopoldi*, *P. motoro*, *P. orbignyi*, *P. scobina*, e *P. sp. aff. motoro*), aliado à lenta evolução molecular de Chondrichthyes sugere que se trate de uma *hard polytomy* que

possivelmente não poderá ser resolvida por nenhum marcador molecular utilizando-se os métodos tradicionais de reconstrução filogenética. Marques (2000) encontrou essencialmente os mesmos resultados desse trabalho quanto à baixa resolução do relacionamento entre espécies do grupo roseta-ocelado. A principal diferença encontrada por Marques (2000) com relação ao presente trabalho foi o posicionamento de *Potamotrygon schroederi* dentro do grupo roseta-ocelado.

Analisando-se as duas árvores igualmente mais parcimoniosas obtidas por Marques (2000), observa-se que a diferença entre essas árvores ocorre na relação entre *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon* sp.1 e *Potamotrygon yepezi*. No presente estudo não foi incluído a espécie *Potamotrygon yepezi*, mas também foi encontrado discordância entre árvores de acordo com o método de reconstrução filogenética e quantidade de caracteres analisados no relacionamento entre *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon* sp.1 e, discordando de Marques (2000), *P. schroeder*. Essa baixa resolução entre essas *taxa* provavelmente deve-se a um problema de enraizamento da árvore filogenética, devido a grande distância genética entre o grupo externo e as espécies da família Potamotrygonidae. Essa questão é discutida mais profundamente no capítulo 3. Marques (2000) sugere que *Plesiotrygon iwamae* esteja mais relacionada com a espécie aqui definida como *Potamotrygon* sp.1. A dificuldade da determinação da relação entre essas espécies, além do problema do enraizamento, pode estar associada a eventos de especiação sucessivos relativamente rápidos no tempo evolutivo e/ou ao fato de *Plesiotrygon iwamae* possuir um comprimento de ramo filogenético longo, que pode produzir o chamado efeito de atração por ramos longos (*Long Branch Attraction*) (Felsenstein, 1978). Esse comprimento de ramo longo pode se dever a um artefato pela não amostragem de espécies relacionadas a *Plesiotrygon iwamae* ou por evolução molecular mais rápida nessa espécie. Uma nova forma de *Plesiotrygon* que pode

representar uma nova espécie foi reportada na literatura de aquário, mas não há espécimes no museu (Carvalho *et al.*, 2003). As várias características morfológicas únicas para essa espécie também podem sugerir uma taxa de evolução mais acelerada por Seleção Natural positiva.

A rápida especiação do grupo roseta-ocelado pode ser considerado um evento de radiação, *i.e.* um rápido aumento, no tempo evolutivo, do número de espécies de um clado em relação a um clado irmão (Schluter, 2000). Considerando que a bacia Amazônica (que possui a maior diversidade da família) foi relativamente bem amostrada nesse estudo, que a bacia do Orinoco foi amostrada pontualmente, e pela literatura à respeito do número e distribuição geográfica das espécies da família Potamotrygonidae, as evidências indicam que o grupo roseta-ocelado tenha sofrido um processo de radiação recente no tempo evolutivo, com o surgimento de pelo menos cinco espécies nos últimos dois milhões de anos, o que pode ser reforçado pela dificuldade na delimitação taxonômica das espécies desse grupo.

1.5.2 Biogeografia da família Potamotrygonidae

1.5.2.1 Origem e diversificação inicial da família Potamotrygonidae

O ancestral da família Potamotrygonidae provavelmente se adaptou à vida em água doce entre 23 e 15 milhões de anos (Lovejoy *et al.*, 1998; Marques, 2000) durante um evento de transgressão marinha que ocorreu nesse período na foz do rio paleo-Amazonas-Orinoco, região que atualmente corresponde ao lago Maracaibo, Venezuela. Durante grande parte do Mioceno grandes lagos e mares continentais existiram, provavelmente havendo um grande espectro de situações aquáticas, desde rios de água doce, lagos e charcos até corpos d'água com influência marinha (Lundberg *et al.*, 1998),

locais propícios para adaptação de organismos marinhos a ambientes progressivamente dessalinizados. Nessa época, os rios que drenam o que é hoje a Amazônia ocidental e bacia do Orinoco drenavam até o Lago Pebas e daí para o rio paleo-Amazonas-Orinoco, rio que drenava grande extensão da América do Sul em sentido Sul-Norte, correndo paralelamente aos Andes e desembocando no mar do caribe. Nessa época, as cordilheiras Colombiana-Venezuelana, Cordilheira Central e Cordilheira Leste ainda não haviam soerguido, havendo interconexão entre as drenagens das bacias dos rios Magdalena, Orinoco e Amazonas; atualmente isoladas. Por volta de 11,8 milhões de anos atrás aparece a Cordilheira Colombiana-Venezuelana dividindo permanentemente as bacias do Magdalena e Llanos. Por volta de 10 milhões de anos ocorreu o soergimento da Cordilheira Central e Cordilheira Leste. Nessa época o ancestral de *Potamotrygon* provavelmente já havia surgido uma vez que hoje existem espécies desse gênero que são endêmicas das bacias do rio Magdalena (*Potamotrygon magdalenae*) e do lago Maracaibo (*Potamotrygon yepezi*).

Foi estimado nesse estudo que a especiação entre *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon* sp.1 e *Potamotrygon schroederi* ocorreu, respectivamente, há aproximadamente 7,68 (6,10 – 9,57) milhões de anos atrás e 6,77 (5,61 – 7,93) milhões de anos atrás, com calibração a partir dos dados de Lovejoy *et al.* (1998) e Marques (2000), respectivamente. Essas estimativas de idade são compatíveis com os eventos geológicos da bacia amazônica. Introgressões marinhas a partir da bacia do Maracaibo para a Bacia Amazônica aconteceram até oito milhões de anos atrás, quando as cordilheiras do norte da América do Sul fecharam permanentemente a conexão da Amazônia Ocidental com o mar caribenho (Lundberg *et al.*, 1998). Evidências biológicas também dão suporte para esse cenário. Marques (2000), encontrou que *Potamotrygon yepezi*, espécie endêmica da bacia do Maracaibo, é espécie-irmã de

Plesiotrygon iwamae e *Potamotrygon* sp.1, separadas há cerca de 10 milhões de anos atrás, quando o soerguimento das Cordilheiras Central e Leste isolou a bacia do Maracaibo da bacia Amazônica. Interessantemente, *Plesiotrygon iwamae* é restrita ao canal do rio Amazonas enquanto que *Potamotrygon schroederi* é restrita às bacias do rio Negro e rio Orinoco e *Potamotrygon* sp.1 é restrita à bacia do rio Negro. Nenhum evento biogeográfico foi proposto que possa explicar essa relação, mas devido a grande diferença físico-química da água entre o rio Amazonas e rio Negro (Sioli, 1984) é possível que tenha havido especiação por adaptação divergente a esses diferentes ambientes.

1.5.2.2 Origem do grupo roseta-ocelado

Nesse estudo foi estimado que a radiação das espécies do grupo roseta-ocelado ocorreu entre 2,04 (1,32 – 3,28) e 1,79 (1,18 - 1.79) milhões de anos atrás, com calibração a partir dos dados de Lovejoy *et al.* (1998) e Marques (2000), respectivamente. A origem da radiação pode estar relacionada com as oscilações climáticas ocorridas no Pleistoceno que acarretaram mudanças do nível eustático dos oceanos pela alternância do derretimento e solidificação de geleiras (Molnar, 2004). Isso pode ter alterado o nível das águas da bacia Amazônica em diferentes episódios. Em períodos nos quais o nível das águas do médio e baixo Amazonas estava mais elevado que o presente, uma espécie ancestral do grupo roseta-ocelado presente na calha do rio Amazonas e nas partes baixas dos afluentes, teria colonizado trechos à montante de regiões com descontinuidades geológicas dos afluentes; e, com a posterior diminuição do nível das águas, essas populações teriam fluxo gênico impedido com as populações à jusante das descontinuidades geológicas nos afluentes e da calha principal

do rio Amazonas, resultando na diversificação em novas espécies. Esse modelo comporta o fato de algumas espécies do grupo roseta-ocelado não ocorrerem à jusante de cachoeiras (por exemplo, *Potamotrygon* sp.2, no rio Tapajós, *P. leopoldi* no rio Xingu, *P. henlei* no rio Tocantins). Também comporta o fato de que as relações filogenéticas das espécies desse grupo não sejam resolvidas, já que as espécies teriam surgido num curto espaço de tempo ou mesmo simultaneamente, e possivelmente de um mesmo ancestral amplamente distribuído na calha do rio Amazonas. Reconstruções filogenéticas tradicionais partem do pressuposto de que a especiação seja um processo dicotômico, onde uma espécie ancestral dá origem a duas novas espécies. Em eventos de especiação onde três ou mais espécies surgem de um mesmo ancestral, a relação entre essas espécies aparecerá numa filogenia de forma politômica (Wiley *et al.*, 1991). Em favor desse modelo, foi reportado para espécies de tucunaré (*Cichla*), eventos cladogênicos datando de 2,9 - 2,16 milhões de anos atrás, separando as espécies *Cichla* sp. do baixo Amazonas e *Cichla temensis* (rio Negro); e separando *Cichla* sp. do baixo Amazonas e *Cichla* sp. do Xingu (Willis, 2006). As relações filogenéticas entre essas três espécies não foram resolvidas pelos marcadores moleculares alça D (*D-loop*) e Citocromo *b*, mesmo em se tratando de um peixe teleósteo cujo genoma mitocondrial presumidamente evolui a taxas mais altas que peixes cartilagionosos, e utilizando o marcador molecular que presumidamente evolui mais rapidamente no genoma mitocondrial (alça D). A separação entre espécies irmãs de gênero *Austrofundulus* da bacia Amazônica e do Orinoco é também estimada em aproximadamente 2 milhões anos (Hrbek *et al.*, 2005b).

Uma hipótese biogeográfica alternativa, mas não incompatível, é a de que o Arco do Purus (Lundberg *et al.*, 1998) tenha funcionado como barreira biogeográfica da ictiofauna amazônica até o Pleistoceno e não até oito milhões de anos atrás (Plioceno)

conforme aceito hoje (Lundberg *et al.*, 1998). Deposições de tipo lacustre na região de Tefé, AM datadas do Pleistoceno suportam esse cenário (Vega, com. pessoal). Nesse cenário, as espécies de potamotrigonídeos teriam distribuição restrita aos rios situados à oeste do Arco de Purus até o período de sua transposição há cerca de 2 milhões de anos, uma vez que elas colonizaram a América do Sul na sua porção nordeste. A filogenia da família Potamotrygonidae contém interessantes informações que corroboram esse cenário. As únicas espécies do gênero *Potamotrygon* que ocorrem a leste da suposta localização geográfica do Arco do Purus são representantes do grupo roseta-ocelado, originadas há cerca de 2,00 (1.18 - 3.28) milhões de anos atrás (figs. 14 e 15, Tabela 1). *Plesiotrygon iwamae*, adaptada a viver na calha do rio Solimões, surgiu há cerca de 7 (5,61 – 9,57) milhões de anos atrás, (figs. 14 e 15, Tabela 1). A espécie de acará-disco *Symphysodon* sp. tem distribuição do alto ao baixo Amazonas e tributários, mas em recente estudo, Hrbek e Farias (não-publicado) encontraram divergência genética de 4% na alça D entre as populações a leste e oeste da região provável do Arco do Purus. Este nível de divergência corrobora a hipótese de que o Arco servisse de divisor de fauna até recentemente no Pleistoceno.

O rio Negro presentemente desemboca no rio Amazonas próximo à cidade Manaus, AM, região a jusante do suposto Arco de Purus. Entretanto, a conexão faunística entre o rio Negro e baixo Amazonas provavelmente se deu recentemente, período próximo à idade da radiação do grupo roseta ocelado. Essa conclusão parte do fato de que existem espécies de potamotrigonídeos surgidas há cerca de 7 milhões de anos atrás (*Potamotrygon* sp. e *P. schroederi*, Tabela 1) cujas distribuições são restritas às bacias dos rios Negro/Orinoco, embora as espécies de potamotrigonídeos distribuídas na porção média e baixa do rio Amazonas não sejam mais antigas que 2 milhões de anos atrás. Franzinelli e Igreja (2002) reportam que eventos neotectônicos controlam a

orientação do baixo rio Negro presentemente. A região do baixo Negro é peculiar por apresentar uma enorme largura e um dos maiores arquipélagos de ilhas fluviais do mundo. Assim o curso do baixo rio Negro pode ter se alterado no Pleistoceno, talvez em consequência de um evento tectônico relacionado com a subsidência do Arco do Purus. Essa conexão faunística recente é corroborada pelas espécies-irmãs de tucunaré *Cichla* sp. do baixo Amazonas e *Cichla temensis* do rio Negro, que se separaram há aproximadamente 2,60 a 2,16 milhões de anos atrás (Willis, 2006).

CAPÍTULO 2

Filogeografia de *Potamotrygon motoro* (Potamotrygonidae) na bacia Amazônica, e discussão sobre a delimitação taxonômica de *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina*

2.1 INTRODUÇÃO

A família de arraias de água doce Potamotrygonidae como é reconhecida hoje é composta por 16 (Carvalho *et al.*, 2003) a 18 (Rosa, 1985b) espécies consideradas taxonomicamente válidas. Entretanto, a taxonomia da família não é bem resolvida contendo várias espécies taxonomicamente dúbias, e pelo menos cinco espécies não descritas (Carvalho *et al.*, 2003). Carvalho *et al.* (2003) sugerem ainda que algumas espécies com ampla distribuição geográfica (por exemplo *P. motoro*, *P. orbignyi*) podem ser subdivididas. O trabalho de taxonomia à respeito das espécies da família é dificultado pelo fato de que muitas espécies de *Potamotrygon* são pobremente descritas; falta de material adequado; alto grau de policromatismo intraespecífico e sobreposição de caracteres merísticos, morfométricos e de coloração entre espécies (Carvalho *et al.*, 2003).

Na Sistemática Biológica existe uma vasta literatura sobre conceitos e metodologias para reconstrução filogenética, bem como dezenas de conceitos de espécies, porém muito pouca atenção foi dispensada a metodologias operacionais para a delimitação de espécies (Wiens & Penkrot, 2002). Mais de 20 definições de espécie foram propostas nos anos recentes, e, conforme discutido por Hey (2001b) este fato é um resultado direto do conflito entre a faculdade humana instintiva de criar categorias a

partir da percepção de padrões recorrentes no mundo natural e a verificação da existência de grupos de organismos relacionados (grupos evolutivos) que são coesos por processos evolutivos comuns, e separados de outros grupos devido à ausência de processos evolutivos compartilhados (Hey, 2001b). Essa categorização a partir de padrões recorrentes, inerente à condição humana, é prática comum da taxonomia tradicional, e parte da observação de que alguns organismos são similares entre si e diferentes dos outros, observação que varia tremendamente de acordo com o observador (famoso debate nos meios acadêmicos entre taxonomistas lumpers /splitters, Hey, 2001b). Porém, em anos recentes vêm crescendo os esforços em se estabelecer metodologias que utilizem critérios objetivos na delimitação de espécies, baseadas em conceitos de grupos evolutivos, alguns dos quais valendo-se de critérios estatísticos (e.g. Templeton, 2001; Wiens & Penkrot, 2002). Muitas dessas novas abordagens utilizam dados genéticos como ferramenta importante na delimitação de espécies. Um desses métodos novos foi proposto por Templeton (2001) para a delimitação de espécies segundo o “Conceito de Coesão de Espécie” (cohesion species concept, Templeton, 1989) e foi considerado promissor devido à objetividade e rigor metodológico, além da generalidade de aplicação (Sites Jr. & Marshall, 2003). Uma “espécie-coesa” é definida como uma linhagem evolutiva ou conjunto de linhagens com permutabilidade genética e/ou permutabilidade ecológica (Templeton, 1989). Esse conceito de espécie pode ser testado rigorosamente, em um processo de duas etapas. Primeiro é testado em uma análise *Nested Clade Analysis* (NCA, Templeton, 1995) a hipótese nula de que a amostra represente uma única linhagem evolutiva, por meio da associação entre árvore de genes e a distribuição geográfica desses genes. Caso a hipótese nula seja rejeitada, isso significa que houve evento de fragmentação alopátrica, determinando duas ou mais linhagens evolutivas. As linhagens são determinadas por testes de permutação aleatória

que simulam hipótese nula de distribuição geográfica aleatória para todos os clados dentro de uma categoria hierárquica (Templeton, 2001). Assim, esses testes podem identificar linhagens mesmo com ocorrência de hibridização ou retenção de polimorfismo ancestral, uma vez que as linhagens evolutivas são determinadas estatisticamente e não simplesmente pela presença de grupos reciprocamente monofiléticos (Templeton, 2001).

Somente se a hipótese de que a amostra represente uma única linhagem evolutiva for rejeitada, é aventada a possibilidade dessa amostra representar mais que uma espécie-coesa. Mesmo que tenha sido identificada mais de uma linhagem evolutiva, para elas serem consideradas espécies-coesas distintas, a hipótese nula de que essas linhagens tenham permuta genética (no caso de espécies sexuais) e/ou permuta ecológica tem que ser rejeitada. O teste dessa hipótese pode ser feito por testes estatísticos, levando em conta grau de isolamento reprodutivo, diferença na alimentação, número cromossômico e outros (Templeton, 2001).

No presente trabalho foi estudado a demografia histórica do grupo não-monofilético de arraias da família Potamotrygonidae, identificado no capítulo 1 dessa dissertação, composto pelas espécies *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina*. Esse estudo foi baseado em análise de NCA proposto por Templeton (1995) e por testes de genética de populações. De acordo com o “Conceito Filogenético de Espécies” (Cracraft, 1983) essas espécies não poderiam ser consideradas reais, uma vez que não apresentam monofilismo recíproco. Entretanto, existe diferenciação morfológica suficiente para sugerir que sejam espécies, que, conforme discutido no capítulo 1, originaram-se muito recentemente no tempo evolutivo (nos últimos 2 milhões de anos). De acordo com o critério “Conceito de Coesão de Espécie”, não é necessário que as espécies sejam reciprocamente

monofiléticas (o que provavelmente é a regra entre espécies originadas recentemente, Funk & Omland, 2003) uma vez que a análise NCA determina linhagens evolutivas por critérios estatísticos, medindo níveis de probabilidades para a estimar a força da inferência,. O tempo que uma espécie leva para atingir o monofiletismo é proporcional a duas vezes o seu tamanho efetivo populacional, e o tempo para o monofiletismo recíproco entre espécies irmãs ser atingido é proporcional a quatro vezes o tamanho efetivo das espécies (Avice, 2000). Uma espécie com ampla distribuição geográfica, como por exemplo, na bacia Amazônica, provavelmente tem um tamanho populacional muito grande e caso eventos de especiação a partir dessa espécie ancestral ocorram, espera-se que por um longo tempo existirão espécies não-monofiléticas.

Conforme sugerido no capítulo 1, provavelmente as espécies do grupo roseta-ocelado tenham surgido recentemente no tempo evolutivo (dois milhões de anos atrás) e possivelmente algumas dessas espécies tenham se originado a partir de uma mesma espécie ancestral que ocupava a calha principal do rio Amazonas. *Potamotrygon motoro* é a espécie da família Potamotrygonidae mais amplamente distribuída, ocorrendo em todas as bacias hidrográficas onde ocorrem espécies da família. (Fig. 16), com exceção das drenagens do Atrato, Magdalena, Maracaibo e Parnaíba (Rosa, 1985b). Entretanto, a distribuição de *P. motoro* parece ser mais restrita do que a descrita na literatura, não ocorrendo no rios Tocantins acima da confluência com o Araguaia; nas montantes dos rios Tapajós (acima de Pimental); Xingú, entre outros (Carvalho, comm. pess.; obs pess.). *P. orbignyi*, segundo Rosa (1985b) apresenta uma ampla distribuição, ocorrendo na bacia do Orinoco, desde a Amazônia Colombiana; Guianas; Suriname; até o baixo rio Amazonas (Fig. 17). Os padrões de cor de *P. orbignyi* parecem variar entre localidades (Rosa, 1985b). A dieta de indivíduos de *P. orbignyi* encontrados nos rios Tocantins

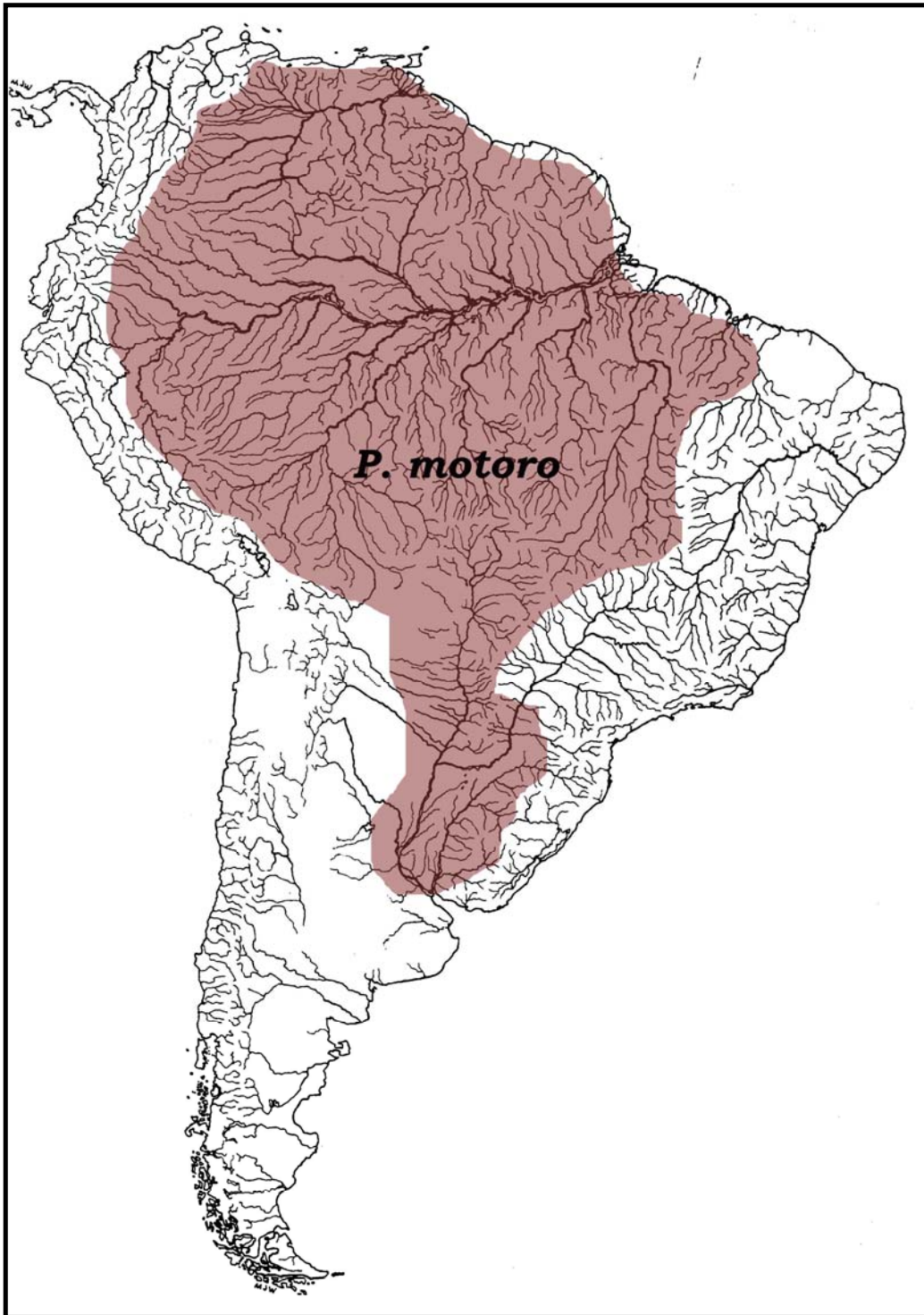


Figura 16. Distribuição geográfica de *Potamotrygon motoro* (conforme Rosa, 1985a)

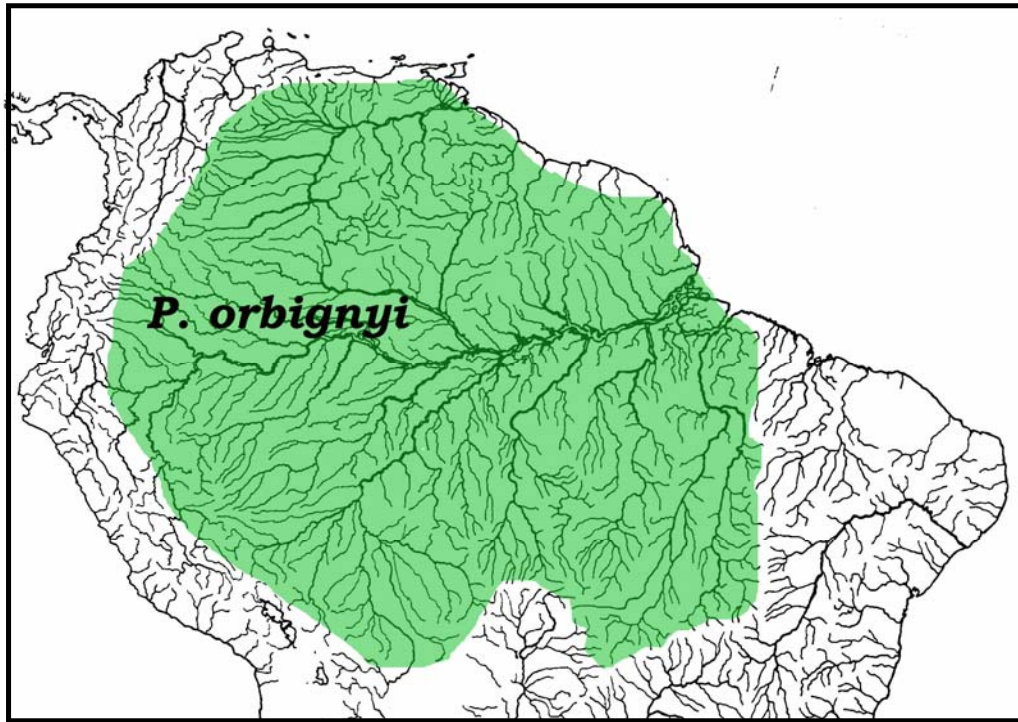


Figura 17. Distribuição geográfica de *Potamotrygon orbignyi* (conforme Rosa, 1985a)

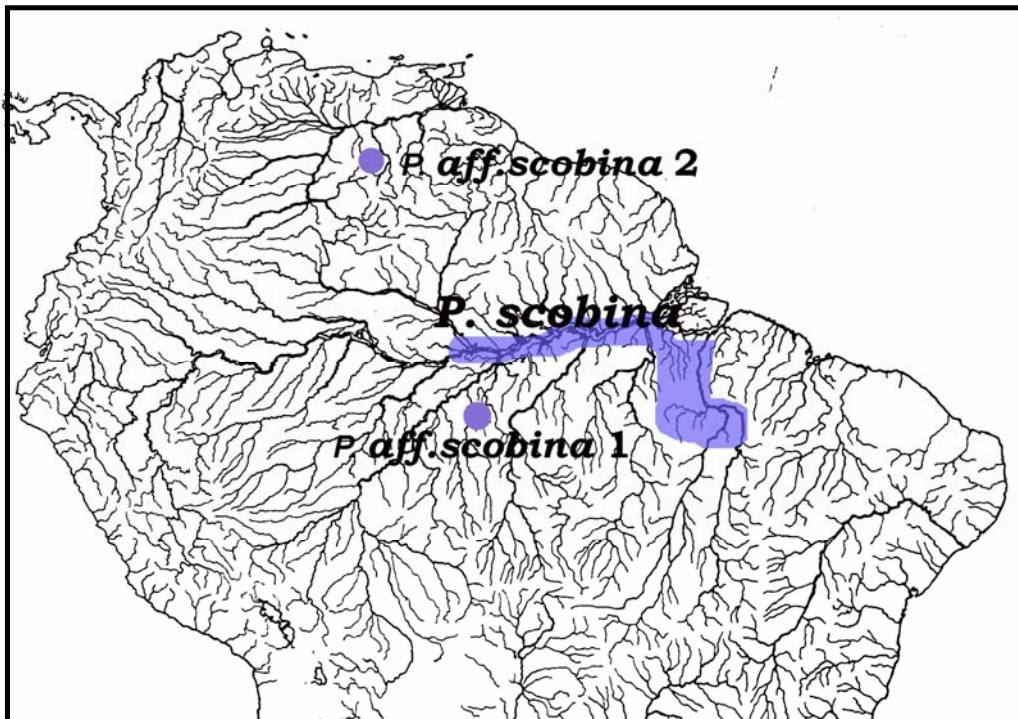


Figura 18. Distribuição geográfica de *Potamotrygon scobina* (conforme Rosa, 1985a)

(Rincon, 2006) e rio Negro (Araújo, não-publicado) parece ser composta principalmente de insetos e outros pequenos invertebrados, evidenciando hábitos mais especializados, contrastando com a espécie *P. motoro*, mais generalista (Araújo, não publicado, Rincon, 2006). *P. scobina* é reportada para a drenagem média e baixa do rio Amazonas, de Manaus a Belém (figura 18, Rosa, 1985a). Entretanto, foram encontrados indivíduos com padrão de coloração semelhante a *P. scobina* nos rios Negro, Aripuanã, Caura e Mavaca (ANEXO I e III).

Potamotrygon motoro é diagnosticada principalmente por apresentar ocelos amarelos ou laranjas maiores que o diâmetro do olho em um fundo oliváceo-marrom a cinza escuro, e dentes relativamente grandes e chatos (Rosa, 1985b; Rosa, 1985a).

Potamotrygon orbignyi é diagnosticada principalmente por padrão de coloração dorsal com rede de pigmentação escura formando reticulações hexagonais (Rosa, 1985b), boca pequena, com largura proximamente igual à distância internarinas, e dentes pequenos.

P. scobina é distinguida de *P. motoro* por dentes relativamente menores, espinhos médio-dorsais menos pontiagudos, distribuídos em fileiras paralelas ao invés de uma única fileira, por ausência de grandes ocelos no disco (Rosa, 1985b). *Potamotrygon scobina* é distinguida de *P. orbignyi* pela ausência de sulco labial (Almeida, 2003), cor da porção ventral da cauda, cúspides dos dentes e padrões de cor (Rincon, 2006). Entretanto, número e forma de espinhos dorsais são caracteres diagnósticos controversos para delimitação de espécies (Rincon, 2006, Charvet-Almeida, com.pessoal), mas que podem ser bons marcadores para separar espécies simpátricas (Carvalho, com. pess.)

O objetivo desse trabalho é verificar se existe associação estatística dos padrões de coloração observados na amostra (ANEXO III) e geografia com haplótipos do gene

mitocondrial ATP sintetase, subunidades 6 e 8 (ATPase). Para isso testamos, por meio da abordagem do Conceito de Coesão de Espécies (Templeton, 2001), se as espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* representem linhagens evolutivas distintas, mesmo não sendo monofiléticas, conforme demonstrado no capítulo 1. Processos de demografia histórica e presente também foram inferidos para essas espécies.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Testar, por meio da abordagem do Conceito de Coesão de Espécies, se as espécies *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina* representem linhagens evolutivas distintas e inferir processos de demografia histórica e presente para essas espécies.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se existe associação estatística dos padrões de coloração e geografia observados nas espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* com seus haplótipos do gene mitocondrial ATP sintetase, subunidades 6 e 8 (ATPase).
- Inferir processos de demografia histórica e presente nos táxons estudados.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Amostragem

Foram coletadas amostras de *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* em 19 localidades da Bacia Amazônica (todas as populações na figura 1 onde foram coletadas essas espécies, totalizando 195 indivíduos (Anexo I).

Foi extraído 1cm³ de músculo da parte ventral dos espécimes coletados que foi armazenado imediatamente em álcool absoluto. Todos os espécimes foram fotografados com exceção dos espécimes de *Potamotrygon motoro* coletados no Rio Juruá. Alguns dos animais capturados foram soltos após a extração do tecido, os demais estão depositados na Coleção Ictiológica do INPA, Coleção particular de Maria Lúcia Góes de Araújo, Coleção particular de Patrícia Charvet-Almeida e Mauricio Pinto de Almeida. (ANEXO I). O tecido foi depositado na Coleção de Tecidos de Genética Animal – CTGA (Fiel Depositário/CGEN) do Laboratório de Evolução e Genética Animal (ICB / UFAM).

2.3.2 Extração de DNA, amplificação e seqüenciamento

O DNA nuclear e mitocondrial foram extraídos de tecido muscular preservado em álcool pelo protocolo padrão de Sambrook *et al.* (1989). Foi amplificados o gene mitocondrial ATPase subunidades 6 e 8 com os *primers* PotaATPf2_Lys 5'–GGGTCYAGCATTAGCCTTT–3' (*forward*) e PotaATPr2 5'–GTTAGTGGTCAGGGGCTTGG–3' (*reverse*) desenvolvidos para este trabalho

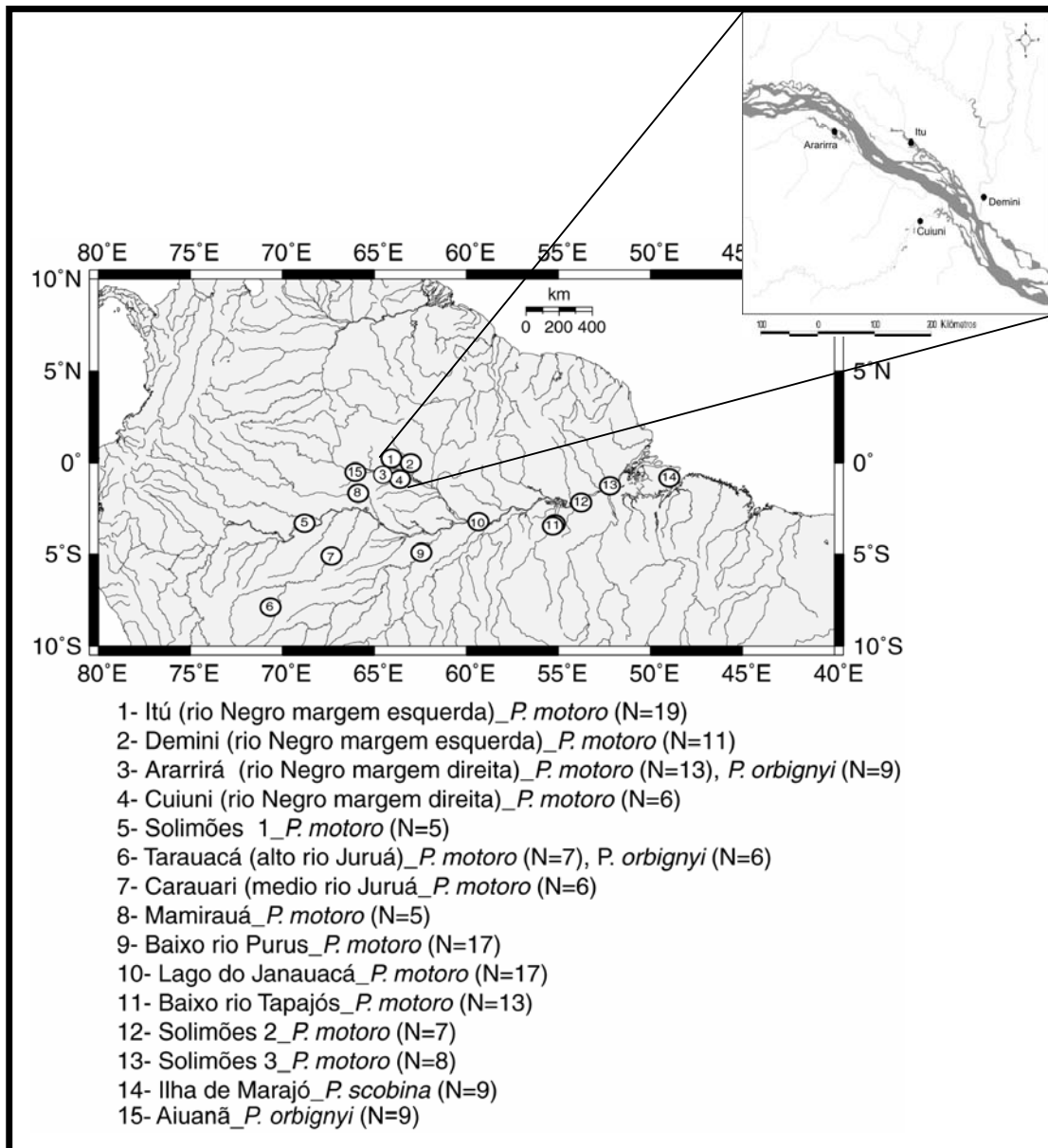


Figura 19. Mapa da distribuição geográfica das amostras utilizadas nas análises de genética populacional. Destacado populações do médio rio Negro.

(Toffoli *et al.*, 2006). Os PCRs foram realizadas em um volume de reação de 25 µl, contendo 2,5µl de dNTPs (10 mM); 2,5µl de tampão 10X (100mMTris-HCL, 500mM KCl); 2µl de cada *primer* (2µM), 3µl de MgCl₂ (25mM); 1µl de DNA (ca. 10ng) e 1U da DNA polimerase *Taq*. Os ciclos de amplificação foram realizados como segue: 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto; anelamento a 52 °C por 35 segundos; e extensão a 72 °C por 90 segundos. Uma extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose a 1%. O produto de PCR foi purificado com o kit *GFX™ PCR DNA Kit (Amersham Bioscience)*, e diluído em 20µl de tampão de diluição. O *primer* reverso PotaATP.r 5'–AGTRGKGTTGGTGTTCCTTCTGG–3' (*reverse*), desenvolvido para este trabalho (Toffoli *et al.*, 2006), foi usado na reação de seqüenciamento do segmento inicial da seqüência dos genes ATPase6/8 enquanto que o *primer* PotaATP-F3 5'–AAATGAGCCTCAATACTCACAGC –3, desenvolvido para este trabalho (Toffoli *et al.*, 2006), foi usado no seqüenciamento interno do gene. Os ciclos da reação de seqüenciamento foram realizados a 52 °C seguindo protocolo recomendado pelo fabricante do kit *ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Bioscience)*. Os ciclos de reação de seqüenciamento foram realizados num volume final de 10µl contendo 4µl de DNA, 2µl de *primer* a 0,2µM; 2µl de tampão suprido pelo kit *ET* e 2µl do *mix ET*. Os produtos amplificados nos ciclos de seqüência foram precipitados usando a precipitação padrão por acetato de amônio/etanol. Posteriormente esses produtos foram ressuspensos em formamida Hi-Di e resolvidas no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE-Healthcare). Foram seqüenciados um total de 790 pb de 195 indivíduos.

2.3.3 Rede de haplótipos (*haplotype networks*) e análise dos clados hierarquizados (NCA)

Foi estimada uma rede de haplótipos usando o programa TCS 1.18 (Clement *et al.*, 2000) que implementa o algoritmo de parcimônia estatística (SP) descrito por Templeton *et al.* (Templeton *et al.*, 1992). Os indivíduos das três espécies formais foram incluídos e analisados em conjunto em uma mesma matriz de dados. Foram incluídos indivíduos de 19 localidades na análise NCA (Figura 1 onde aparecem as espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina*, Anexo I). Amostras coletadas 100 Km ou menos de distância, seguindo o curso do rio, foram agrupadas em uma mesma população. A hierarquização da rede de haplótipos foi feita segundo algoritmo descrito em Templeton *et al.* (1987) e Templeton e Sing (1993), onde primeiramente os haplótipos distantes por um passo mutacional são agrupados, seguindo a direção ponta-interior da árvore haplotípica, até todos os haplótipos terem sido agrupados em clados separados por um passo mutacional. Em seguida esses clados são considerados como haplótipos e o procedimento de agrupamento é reiniciado. No final, a rede haplotípica possuirá uma série de clados hierarquizados de n-passos mutacionais. Clados com maiores passos mutacionais são considerados cronologicamente mais antigos. A análise NCA foi realizada no programa GEODIS 2.4 (Posada *et al.*, 2000) cujos resultados foram analisados por meio da chave de inferência descrita em Templeton (2004). As distâncias geográficas entre as localidades analisadas foram estimadas em quilômetros, seguindo o curso dos rios.

2.3.4 Análises estatísticas populacionais

Para as análises estatísticas populacionais foram utilizados de cinco a 19 indivíduos por localidade, conforme Figura 19. Populações com N amostral menor que cinco indivíduos não foram utilizadas nas análises populacionais. Populações dos rios Itu, Demini, Ararirrá e Cuini, tributários do rio Negro, foram posteriormente analisadas em separado para verificar se existe estrutura populacional entre tributários de margens opostas do rio médio rio Negro. Diferentemente da análise NCA, indivíduos classificados como *P. orbignyi* e *P. scobina* foram tratadas separadamente de *P. motoro* nas análises de genética de populações. Isso justifica-se porque as estatísticas genético-populacionais são baseadas em índices sumários que não testam a existência de linhagens evolutivas mas somente comparam índices entre populações.

O nível de variação genética dentro das populações foi medida através do número de haplótipos observados em cada população; e dos índices diversidade gênica (h) e diversidade nucleotídica (π) (Nei, 1987). A diversidade gênica (h) é a probabilidade de duas seqüências, escolhidas aleatoriamente de uma população, serem diferentes (Li, 1997). Esta medida de polimorfismo é equivalente ao nível de heterozigidade esperada, quando se trata de marcador com herança co-dominante (dados diplóides). A diversidade nucleotídica (π), é uma medida do número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas seqüências (Tajima, 1983; Nei, 1987). Em uma população com reprodução aleatória, π é simplesmente heterozigidade no nível nucleotídico.

Para testar se as populações analisadas sofreram expansão populacional foram realizados o teste D de Tajima (1989) e F_s de Fu (1997). O teste de Tajima examina a relação entre o número de sítios segregantes e a diversidade nucleotídica. O teste de Fu

é baseado na probabilidade de observar determinado número de alelos em uma amostra de determinado tamanho condicionado ao número médio observado de diferenças par-a-par.

Foi calculado o índice de fixação (F_{ST}) para populações tomadas par-a-par. A distribuição nula de valores de F_{ST} par-a-par sob a hipótese de ausência de diferença entre as populações foi obtida pela permuta de haplótipos entre as populações. O valor P do teste é a proporção de permutações levando a um F_{ST} igual ou maior ao observado (Excoffier *et al.*, 2005).

Para testar estrutura de população, foi efetuada uma análise de variância molecular (AMOVA), considerando somente populações de *Potamotrygon motoro* com $N > 5$ (Fig. 19, excluindo a população do Marajó, devido incerteza quanto à posição taxonômica). Essa análise é análoga às análises-padrão de variância (ANOVA) porém avalia a variância de frequências gênicas, levando em conta o número de mutações entre haplótipos, ou seja, usa informação das relações genealógicas dos haplótipos, uma vantagem em relação à medida F_{ST} (Allendorf & Luikart, 2006). Foi testada a hipótese, por meio da análise AMOVA, de que todas as localidades amostradas de *P. motoro* pertencem a uma grande população panmítica. Também foi testado se as amostras coletadas em tributários localizados em margens opostas do rio Negro, distantes a menos de 100 Km entre si (Itu e Demini na margem esquerda, Ararirá e Cuiuni na margem esquerda, Fig. 19) pertencem a uma única população panmítica e se populações coletadas em uma mesma margem do rio Negro formam um grupo que é diferenciado das populações da outra margem.

O número de migrantes por geração foi estimado por meio da sua relação com o índice F_{ST} sob o modelo de migração de ilhas para haplótipos $F_{ST} = 1/Nm+1$. O nível de significância das comparações múltiplas foi corrigido pela correção de Bonferroni

(Rice, 1989).

O Teste de Mantel foi usado para estimar a significância da correlação entre a distância genética (F_{ST}) e distância geográfica entre todas as populações amostradas; considerando apenas populações de *P. motoro* e considerando apenas as populações de *P. motoro* do rio Negro distantes menos de 100 Km entre si (Itu, Demini, Ararirrá e Cuiuni). A distância entre as localidades amostradas foi estimada em Km ao longo do curso dos rios. Foram efetuadas 10.000 permutações para calcular a distribuição aleatória dos dados.

Todas as análises de genética de populações foram realizadas no programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Rede de haplótipos e NCA

Não foi encontrado nenhum subclado na rede haplotípica separado por conexão ambígua no nível de 95% de confiança pela parcimônia estatística. A rede haplotípica, formou clados hierarquizados até o nível 4 (Fig. 17). Os clados hierarquizados cuja hipótese nula de panmixia foi rejeitada estão discriminados na Tabela 2.

Os números em parênteses apresentados abaixo representam os números de referência ao ANEXO I e são indicados somente para indivíduos que apresentam posições divergentes distintas nos clados hierarquizados em relação à maioria dos representantes de sua espécie em uma dada localidade. A análise de NCA sugere que o evento demográfico mais antigo representa uma expansão geográfica. O evento sucessivo mais recente, no nível 4, foi a fragmentação alopátrica ocorrida nos clados 4-1

e 4-2. A fragmentação do clado 4-1 representa provavelmente a separação entre o clado contendo *P. motoro* e *P. orbignyi* do rio Tarauacá; *P. motoro* do rio Juruá, Mamirauá, médio Solimões, Médio Negro, Purus (haplótipos 1 ao 7, ANEXO II) do clado contendo *P. motoro* de Maués; *P. scobina* da baía de Marajó; *P. orbignyi* do Tarauacá, *P. motoro* do Solimões (haplótipos 8 ao 11, ANEXO II) e do clado contendo *P. orbignyi* de Tarauacá, Solimões e Aripuanã, além de um indivíduo de *P. motoro* do Tapajós (480) e um indivíduo (149) que apresenta padrão de cor similar a *P. scobina* porém é mais relacionado com *P. orbignyi* do rio Aripuanã (haplótipos 12 ao 18, ANEXO II). A fragmentação do clado 4-2 ocorre entre o clado contendo *P. orbignyi* do Tapajós e um indivíduo de *P. motoro* também do Tapajós (477) (haplótipos 44 e 45,) do clado contendo *P. aff. scobina 2* do rio Caura, Venezuela; *P. motoro* do médio e baixo Amazonas; *P. motoro* do Tapajós (478); *P. scobina* (315); *P. motoro* do rio Purus; *P. motoro* do rio Aripuanã; e *P. aff. scobina* (372) do rio Caura, Venezuela. (Haplótipos 29 a 43, ANEXO II).

O evento inferido no nível 3 foi o fluxo gênico restrito com isolamento por distância, nos clados 3-4 e 3-5. No clado 3-4 o fluxo gênico é restrito entre o clado contendo *P. orbignyi* do alto e médio rio Negro (haplótipos 25 ao 28, ANEXO II) do clado contendo *P. motoro* do alto e médio rio Negro; *P. aff. scobina 2* do rio Mavaca,

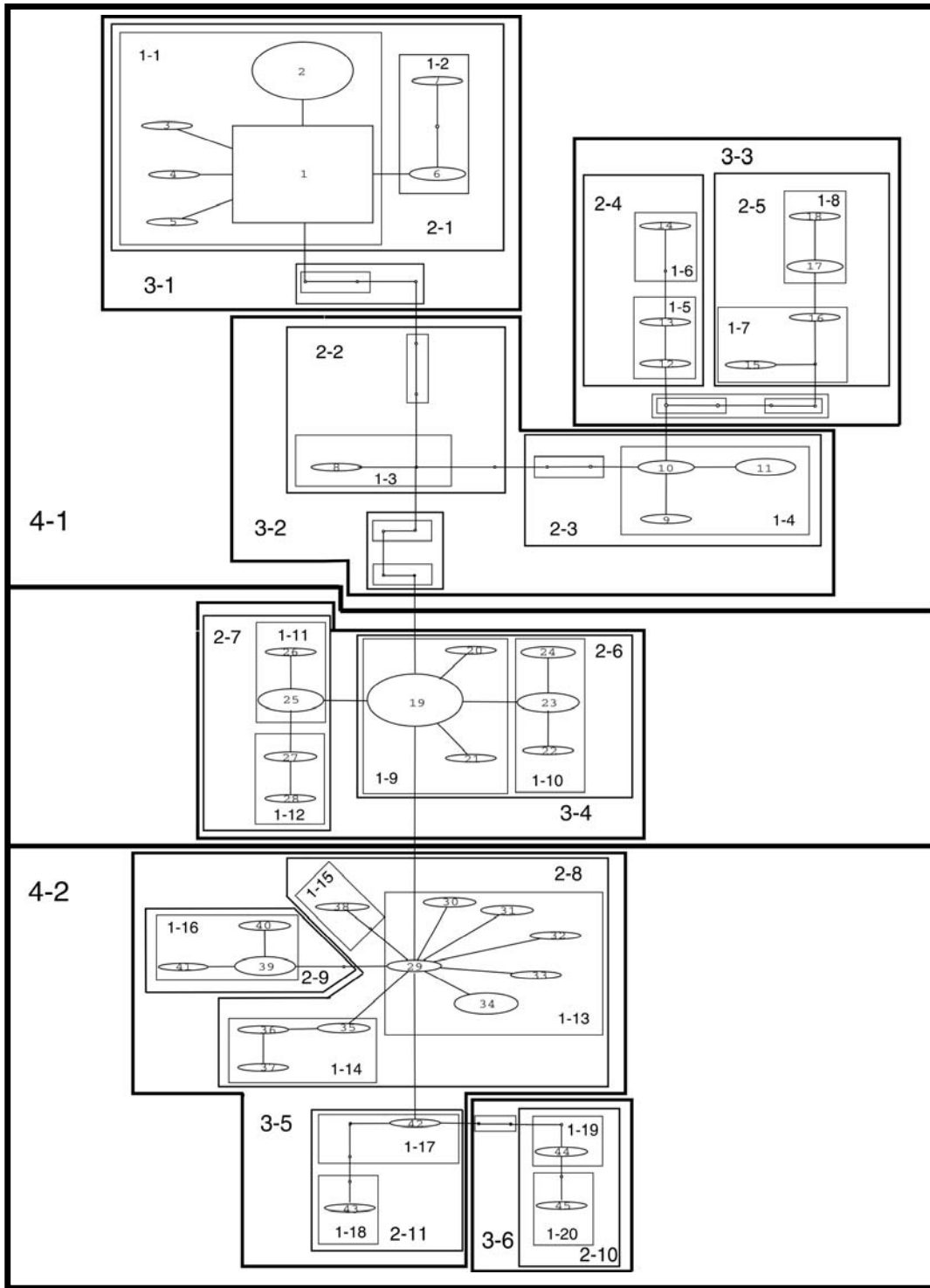


Figura 20. Rede haplotípica de clados hierarquizados por meio da análise NCA.

Venezuela; *P. motoro* do rio Parguaza, Venezuela; e *P. motoro* do rio Tapajós (haplótipos 19 ao 24, Anexo II).

Tabela 2. Resultado das análises do agrupamento dos clados hierarquizados. Somente clados com permutações significativas (X^2) para estrutura geográfica constam nesta tabela.

Clado	Chave de inferência	Padrão inferido
1-1	1-2-3-4-No	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
1-13	1-2-3-4-No	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
2-1	1-2-3-4-No	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
2-6	1-19-20-2-3-5-15-No	Fragmentação no passado e/ou colonização a longa distância
2-8	1-2-3-4-9-No	Fragmentação alopátrica
3-4	1-2-3-4-No	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
3-5	1-2-3-4-No	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
4-1	1-2-3-4-9-No	Fragmentação alopátrica
4-2	1-2-3-4-9-No	Fragmentação alopátrica
Total	1-3-11-12-No	Expansão geográfica contígua

Os eventos demográficos inferidos no nível 2 foram: fragmentação alopátrica no clado 2-8, provavelmente por evento vicariante separando *P. motoro* do rio Purus (haplótipos 35 ao 37, ANEXO II) do restante dos indivíduos do seu clado, constituídos principalmente por *P. motoro* do rio Solimões (haplótipos 29 ao 34 e 38, ANEXO II). O clado 2-6 o evento demográfico inferido foi fragmentação no passado e/ou colonização por longa distância entre *P. motoro* do sistema Orinoco-Negro (haplótipos 19 ao 21, ANEXO II) do clado de *P. motoro* do rio Tapajós (haplótipos 22 ao 24, ANEXO II). No clado 2-1 foi inferido fluxo gênico restrito com isolamento por distância, provavelmente entre *P. motoro* do rio Purus (haplótipos 6 e 7, ANEXO II) e *P. motoro* mais amplamente distribuído no médio Amazonas, rio Juruá e seu tributário Tarauacá, e rio Negro (haplótipos 1 ao 5, ANEXO II).

O evento inferido no nível 1 foi fluxo gênico restrito com isolamento por distância nos clados 1-1 e 1-13. No clado 1-1 o fluxo gênico pode estar restrito com isolamento por distância entre o clado mais amplamente distribuído de *P. motoro* presente nos rios Juruá e seu afluente Tarauacá; Mamirauá e médio e baixo Solimões

(haplótipos 1, 3, 4 e 5 ANEXO II) do clado de *P. motoro* do rio Negro (haplótipo 2, ANEXO II). Os indivíduos (496) e (497) de *P. orbignyi* do Tarauacá possuem o haplótipo 1 e o indivíduo (503) de *P. orbignyi* do Tarauacá apresenta o haplótipo 5. No clado 1-13 o fluxo gênico restrito com isolamento por distância ocorre entre o clado de *P. motoro* do médio e baixo Solimões (haplótipos 30,31,32,33,34, ANEXO II) do clado *P. scobina* (315) da baía de Marajó (haplótipo 33, ANEXO II); o clado *P. motoro* (478) do rio Tapajós (haplótipo 31, ANEXO II); e *P. aff. scobina* do rio Caura, Venezuela (haplótipo 29, ANEXO II).

2.4.2 Análise genético-populacional e demográfica

Os parâmetros dos níveis de variabilidade genética populacional podem ser visualizados na Tabela 3. O número de haplótipos por população variou de no mínimo um e no máximo seis, com monomorfismo observado nas localidades do Alto Juruá e Alto Solimões. Os níveis de diversidade gênica variaram de 0,327 ($\pm 0,153$) a 0,933 ($\pm 0,122$) e os de diversidade nucleotídica com o mínimo de 0,0004 ($\pm 0,0005$) ao máximo de 0,010 ($\pm 0,006$). Com exceção da população de *P. motoro* do Rio Tapajós nenhuma outra localidade apresentou valores significativos para os testes de neutralidade de D de Tajima e F_s de Fu.

Tabela 3. Índices de diversidade genética e testes de neutralidade seletiva para cada espécie por localidade, onde N= N° amostral.

Espécies	Localidade da Amostragem	N	No. de Haplotipos	h = Diversidade Gênica (Haplotípica)	π = Diversidade Nucleotídica (por sítio)	Tajima's D	Fu's F_s
<i>Potamotrygon motoro</i>	Rio Itú (Trib. Negro esq.)	19	2	0,515 ± 0,052	0,008 ± 0,004	2,906	12,04
	Demini (Trib. Negro esq.)	11	2	0,327 ± 0,153	0,005 ± 0,003	-0,179	6,82
	Ararirra (Trib. Negro dir.)	13	3	0,500 ± 0,136	0,006 ± 0,003	0,871	5,62
	Cuiuni (Trib. Negro dir.)	6	2	0,533 ± 0,172	0,008 ± 0,005	1,325	6,36
	Lago Janauacá	17	5	0,574 ± 0,127	0,008 ± 0,005	0,668	4,64
	Medio rio Juruá (Carauari)	6	2	0,333 ± 0,215	0,0004 ± 0,0005	-0,933	-0,002
	Alto rio Juruá (Tarauaca)	7	1	0	0	0	0
	Baixo rio Purus	17	5	0,684 ± 0,098	0,007 ± 0,004	0,922	3,81
	Mamirauá	5	3	0,700 ± 0,218	0,001 ± 0,001	-0,973	-0,83
	Baixo rio Tapajós	13	6	0,769 ± 0,103	0,004 ± 0,003	-1,786*	0,21
	Solimões 1	5	1	0	0	0	0
	Solimões 2	7	3	0,762 ± 0,115	0,008 ± 0,005	0,917	4,38
	Solimões 3	8	6	0,928 ± 0,084	0,002 ± 0,001	-0,920	-2,83
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	Alto rio Juruá (Tarauaca)	6	5	0,933 ± 0,122	0,010 ± 0,006	0,817	0,433
	Alto rio Negro (Aiuana)	9	3	0,556 ± 0,165	0,0009 ± 0,0008	-0,064	-0,239
<i>Potamotrygon scobina</i>	Ilha de Marajó	9	3	0,556 ± 0,165	0,0037 ± 0,002	-1,578	2,782

Nas análises de AMOVA que consideraram as amostras de *P. motoro* como pertencentes a uma única população panmítica na bacia Amazônica, os resultados evidenciaram a presença de estrutura de população ($F_{ST} = 0.376$, $P < 0,001$, Tabela 6) mostrando que 37,66% da variação ocorreram entre as populações, e 62,34% ocorreram dentro das populações. Uma porção significativa desta variação foi devido às diferenças entre várias comparações das populações de *P. motoro* do Rio Tapajós e da região do Solimões 2 com o restante das outras localidades, resultados estes significativos mesmo após as correções de Bonferroni ($P < 0,00055$). As populações do rio Negro não formam uma única população panmítica, com 16,26% da variação ocorrendo entre as populações, e 83,74% ocorrendo dentro das populações ($P = 0,0311$, Tabela 7). As populações de uma mesma margem do rio Negro não formam um grupo quando comparados à outra margem, com 82,08 % da variação ocorrendo dentro dos grupos e somente 5,92% ocorrendo entre grupos ($P = 0,687$, Tabela 8).

A estimativa do número efetivo de migrantes por geração entre as populações podem ser observados na Tabela 5. Em geral observou-se baixos valores de migrantes por geração, indicativo de um fluxo gênico restrito entre várias localidades.

Tabela 4. Comparações par a par dos valores de F_{ST} entre as populações e espécies analisadas. Valores em azul correspondem a valores significativos antes da correção de Bonferroni ($P < 0,05$) e em vermelho a valores significativos após a correção de Bonferroni ($P < 0,00036$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1.Rio Itu (Trib. Negro esq.)	-															
2.Rio Demini (Trib. Negro esq.)	0,053	-														
3.Rio Ararirra (Trib. Negro dir.)	0,157	0,459	-													
4.Rio Cuiuni (Trib. Negro dir.)	-0,104	-0,076	0,233	-												
5.Lago Janauacá	0,063	0,090	0,303	-0,007	-											
6.Medio rio Juruá (Carauari)	0,243	0,137	0,637	0,213	0,085	-										
7.Mamirauá	0,247	0,181	0,617	0,208	0,069	0,015	-									
8.Baixo rio Purus	0,092	0,094	0,368	0,017	-0,013	0,067	0,052	-								
9.Alto rio Juruá (Tarauaca)	0,283	0,233	0,661	0,294	0,101	0,027	0,072	0,082	-							
10.Baixo rio Tapajós	0,424	0,672	0,180	0,526	0,507	0,804	0,788	0,571	0,820	-						
11.Solimões 1	0,245	0,182	0,628	0,222	0,061	-0,034	0,000	0,042	0,000	0,800	-					
12.Solimões 2	0,167	0,421	0,069	0,192	0,196	0,583	0,546	0,277	0,617	0,291	0,563	-				
13.Solimões 3	0,466	0,729	0,266	0,593	0,527	0,902	0,884	0,593	0,918	0,355	0,904	0,161	-			
14. Alto rio Juruá (Tarauaca) (<i>P. orbignyi</i>)	0,193	0,254	0,399	0,122	0,084	0,311	0,267	0,171	0,353	0,569	0,280	0,319	0,633	-		
15. Rio Aiuanã (Alto Negro) (<i>P. orbignyi</i>)	0,508	0,777	0,320	0,670	0,588	0,953	0,940	0,652	0,966	0,428	0,960	0,447	0,633	0,694	-	
16. Ilha de Marajó (<i>P. scobina</i>)	0,537	0,695	0,593	0,599	0,513	0,829	0,808	0,602	0,849	0,673	0,827	0,581	0,767	0,346	0,819	-

Tabela 5. Comparações par a par dos valores de *Nm* entre as populações e espécies analisadas. Os valores em vermelho correspondem a ausência de fluxo gênico significativo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. Rio Itu (Trib. Negro esq.)	-															
2. Demini (Trib. Negro esq.)	8,92	-														
3. Ararirra (Trib. Negro dir.)	2,67	0,59	-													
4. Cuiuni (Trib. Negro dir.)	inf	inf	1,64	-												
5. Lago Janauacá	7,42	5,05	1,15	inf	-											
6. Medio rio Juruá (Carauari)	1,55	3,13	0,28	1,85	5,32	-										
7. Mamirauá	1,52	2,26	0,31	1,90	6,72	31,29	-									
8. Baixo rio Purus	4,93	4,79	0,86	28,33	inf	6,86	8,96	-								
9. Alto rio Juruá (Tarauaca)	1,26	1,64	0,26	1,20	4,41	17,50	6,36	5,53	-							
10. Baixo rio Tapajós	0,68	0,24	2,27	0,45	0,49	0,12	0,13	0,37	0,11	-						
11. Solimões 1	1,53	2,24	0,30	1,75	7,65	inf	inf	11,27	inf	0,12	-					
12. Solimões 2	2,48	0,69	6,68	2,10	2,05	0,36	0,42	1,30	0,31	1,21	0,39	-				
13. Solimões 3	0,57	0,19	1,37	0,34	0,45	0,05	0,07	0,34	0,04	0,91	0,05	2,60	-			
14. Alto rio Juruá (Tarauaca)																
(<i>P. orbignyi</i>)	2,09	1,47	0,75	3,58	5,41	1,11	1,37	2,42	0,92	0,38	1,28	1,06	0,29	-		
15. Rio Aiuanã (Alto Negro)																
(<i>P. orbignyi</i>)	0,48	0,14	1,06	0,25	0,35	0,02	0,03	0,27	0,02	0,67	0,02	0,62	0,29	0,22	-	
16. Ilha de Marajó (<i>P. scobina</i>)																-
	0,43	0,22	0,34	0,33	0,47	0,10	0,12	0,33	0,09	0,24	0,10	0,36	0,15	0,94	0,11	

Tabela 6. Análise da Variância Molecular (AMOVA) considerando somente populações de *Potamotrygo motoro*. As localidades amostradas não formam uma única população panmítica na bacia Amazônica ($P < 0,001$).

Fonte da variação	d.f.	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	12	187,008	132339 Va	37,66%
Dentro das populações	121	265,045	219045 Vb	62,34%
Total	133	452,052	351,384	

$F_{ST} = 0,37662$

Tabela 7. Análise da Variância Molecular (AMOVA) considerando somente as populações de *Potamotrygon motoro* do rio Negro distanciadas a menos de 100 Km entre si (Itu, Demini, Ararirrá, Cuiuni). As localidades amostradas não formam uma única população panmítica ($P = 0,0311$).

Fonte de variação	d.f.	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	3	25,978	0,51515 Va	16,26
Dentro das populações	45	119,369	2,65265 Vb	83,74
Total	48	145,347	316,780	

$F_{ST} = 0,16262$

Tabela 8. Análise da Variância Molecular (AMOVA) considerando as populações de tributários do rio Negro na margem esquerda (Itu e Demini) como grupos distintos da margem direita (Ararirrá e Cuiuni). Os grupos em margens opostas não foram considerados estatisticamente significantes ($P = 0,687$).

Fonte da variação	d.f.	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	1	12,084	0,19139 Va	5,92
Entre populações dentro dos grupos	2	13,894	0,38786 Vb	12,00
Dentro das populações	45	119,369	2,65265 Vc	82,08
Total	48	145,347	323,189	

$F_{ct} = 0,05922$

No teste de Mantel foi encontrado uma forte correlação entre a variação genética e a distribuição geográfica ao longo das localidades amostradas foi observado em todos os testes; tanto considerando-se todas as espécies ($r = 0,2767$; $P = 0,0205$), como considerando-se somente *P. motoro* ($r = 0,5356$; $P = 0,0004$) e entre as populações de *P. motoro* do rio Negro ($r = 0,901943$; $P = 0,042000$).

2.5 DISCUSSÃO

2.5.1 Demografia histórica

A expansão geográfica inferida pela análise NCA no clado mais abrangente do complexo *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* é compatível com as relações filogenéticas reconstruídas no capítulo 1, indicando que esse complexo de espécies provavelmente se originou por uma expansão geográfica ocorrida há 2 milhões de anos, possivelmente associado com a transposição do Arco do Purus por uma espécie do grupo ou espécie ancestral.

Para vários níveis dos cladogramas hierarquizados da análise NCA é inferido fluxo gênico restrito com isolamento por distância, corroborado pelos valores significativos de F_{ST} e pequeno número de migrantes entre vários pares de populações, além de resultado significativo do teste de Mantel, o que indica que essas espécies tem um baixo poder de dispersão, e apresentam isolamento por distância. Rincon (2006) observou a distribuição de indivíduos das espécies *Potamotrygon orbignyi* e *P. sp.* do rio Tocantins com caudas amputadas, e percebeu que a maioria das observações ocorreu a < 2 Km de comunidades ribeirinhas, o que ele atribuiu a baixo poder de dispersão dessas espécies. Esse isolamento por distância e eventos de fragmentação ocorreram/ocorrem principalmente entre populações do médio e baixo rio Amazonas e seus tributários. De fato, foi inferido fragmentação alopátrica

no clado 4-2 entre *Potamotrygon orbignyi* do rio Tapajós de *P. motoro* mais amplamente distribuída nos rio Amazonas, Purus, Aripuanã e Caura. Fragmentação alopátrica é considerada pré-requisito para o estabelecimento de uma linhagem evolutiva, conforme proposto por Templeton (1989). Seguindo os critérios estabelecidos pela abordagem de Conceito de Espécies coesas, *Potamotrygon orbignyi* do rio Tapajós (clado 3-6, figura 17) é considerada uma linhagem evolutiva distinta, cuja espécie irmã é *P. motoro* amplamente distribuída na bacia Amazônica. Para ser considerada uma espécie-coesa é necessário mostrar que a permutabilidade reprodutiva ou ecológica é rejeitada. *P. orbignyi* do rio Tapajós provavelmente é uma espécie-coesa, uma vez que apresenta padrão de coloração muito distinto de *P. motoro* o que sugere que ocupe nicho ecológico distinto.

Fragmentação alopátrica também foi inferida no clado 4-1, provavelmente relacionada a separação de *P. scobina* da baía do Marajó (clado 3-2, figura 17), e a separação de *P. orbignyi* do rio Aripuanã (clado 3-3, figura 17) do clado de *P. motoro* mais amplamente distribuído no médio Amazonas, Juruá e seu tributário Tarauacá e rio Negro (clado 3-1, figura 17). Novamente essas duas linhagens evolutivas apresentam características morfológicas e padrões de cor (Almeida, 2003 para *P. scobina*), que sugerem tratar-se de espécies-coesas distintas e geograficamente mais restritas, proximamente relacionadas de *P. motoro*, amplamente distribuída na bacia Amazônica.

O fluxo gênico restrito encontrado no clado 3-4 deve-se principalmente à separação entre o clado de *P. orbignyi* do Rio Negro (clado 2-7, figura 17) e *P. motoro* mais amplamente distribuída, principalmente no rio Negro (clado 2-6, figura 17). Novamente *P. orbignyi* é mais proximamente relacionada a *P. motoro*, não tendo relação de parentesco direta com as outras *P. orbignyi* analisadas. *P. orbignyi* do rio Negro apresenta padrão de coloração e dieta distintos de *P. motoro* do rio Negro (Araújo, não publicado), e uma vez que essas espécies são simpátricas, é sugestivo de um evento de especiação por processos ecológicos e não

vicariantes. No nível 2 da análise NCA foi inferido fragmentação alopátrica no clado 2-8, sugerindo que *P. motoro* do rio Purus (clado 1-14, figura 17) represente uma linhagem evolutiva distinta de *P. motoro* do Solimões-Amazonas (clado 1-13 e 1-15, figura 17). Entretanto, para ser elevada ao nível de espécie é necessário a comprovação de isolamento reprodutivo ou ecológico. O padrão de cor de *P. motoro* do rio Purus superficialmente não difere de *P. motoro* do Solimões-Amazonas (obs. pessoal) porém não foi realizada análise morfológica ou ecológica dos indivíduos dessa população. Foi inferido fragmentação no passado ou colonização por longa distância no clado 2-6 entre *P. motoro* do rio Tapajós (clado 1-10, figura 17) e *P. motoro* do rio Negro (clado 1-9, figura 17), processo de difícil explicação. De qualquer maneira, esse evento inferido provavelmente indica a fragmentação de *P. motoro* do rio Tapajós, outro tributário do Amazonas e rio Negro. No clado 2-1, foi inferido fluxo gênico restrito com isolamento por distância entre *P. motoro* do rio Purus (clado 1-2, figura 17) e *P. motoro* mais amplamente distribuído (clado 1-1, figura 17). Provavelmente o fluxo gênico entre indivíduos de *P. motoro* do rio Purus com o restante da bacia é dificultado já que foram inferidos dois eventos (fragmentação e isolamento por distância) para indivíduos da população amostrada nesse rio. O isolamento por distância entre *P. motoro* do rio Negro (haplótipo 2, figura 17) e *P. motoro* do sistema Solimões-Amazonas (haplótipo 1, 3, 4 e 5, figura 17) foi inferido no clado 1-1, o que pode estar relacionado com isolamento histórico ou diferenças na química da água. Esse mesmo padrão foi observado em crocodilianos por Farias *et al.* (2004), Vasconcelos *et al.* (2006) e de Thoisy *et al.* (2006). O clado 1-13 sugere um fluxo gênico restrito entre *P. motoro* do rio Amazonas e outros rios, como *P. motoro* do Tapajós (haplótipo 31, figura 17), e *P. aff. scobina* 2 do rio Caura, Venezuela (haplótipo 29, figura 17).

2.5.2 Variação genética interpopulacional

O fluxo gênico restrito com isolamento por distância encontrado em vários níveis da análise de NCA é fortemente corroborado pelas análises genético-populacionais F_{ST} , AMOVA e teste de Mantel. Foi encontrada estrutura populacional significativa pelo índice de fixação F_{ST} entre vários pares de populações. *Potamotrygon scobina* da baía do Marajó e *P. orbignyi* do rio Negro apresentam estruturação significativa em relação à todas as outras populações, corroborando com o fato de que podem se tratar de espécies diferentes. De acordo com a análise AMOVA, *P. motoro* não forma uma única população panmítica na bacia Amazônica, nem mesmo forma uma única população quando comparadas quatro localidades amostradas a menos de 100 Km entre si (médio rio Negro). A forte relação entre a distribuição geográfica e distribuição da variabilidade genética, *i.e.* fluxo gênico restrito com isolamento por distância, foi evidenciada pelo teste Mantel; significativo mesmo para as populações do rio Negro distantes a menos de 100 Km entre si. Populações coletadas em uma mesma margem do rio Negro não são mais proximamente relacionadas em comparação com as da outra margem, sugerindo que a calha principal do rio Negro não é barreira para dispersão de *P. motoro*. Esses resultados em conjunto evidenciam que *P. motoro* e outras espécies do grupo (*P. scobina* e *P. orbignyi*) possuem baixo poder de dispersão, mesmo a distâncias relativamente curtas (<100 Km), quando comparadas à extensa distribuição geográfica (*P. motoro*).

Peixes com ampla distribuição geográfica podem exibir baixa conectividade genética quando apresentam determinadas características de história natural tais como sedentarismo ou filopatria, que resultam em baixa dispersão (e.g. salmão, Waples *et al.*, 2001). Esse é o caso de espécies do gênero *Cichla* da bacia Amazônica (Willis *et al.*, 2007). Essas espécies apresentam pronunciado territorialismo (filopatria), o que possivelmente determina o baixo fluxo gênico encontrado entre suas populações, e conseqüente estrutura populacional. Ao contrário, *Colossoma macropomum* e *Arapaima gigas* apresentam uma única população

panmítica na bacia Amazônica; ambas as espécies apresentam comportamento de dispersão a longas distâncias (Hrbek *et al.*, 2005a; Santos *et al.*, 2007).

O padrão de estrutura genética encontrado para as arraias-de-água-doce é comparável com elasmobrânquios marinhos. Para a maioria dos estudos com tubarões e arraias foi encontrada estrutura genética maior do que a esperada para espécies com ampla distribuição geográfica (cosmopolitas) (e.g. Graves, 1998; Duncan *et al.*, 2006), e tem sido atribuído, em parte, ao comportamento reprodutivo. Elasmobrânquios não apresentam larvas pelágicas; os jovens são depositados em ovos demersais ou nascidos vivos e a dispersão é feita exclusivamente por estágios juvenis ou adultos. Muitas espécies procriam em criadouros (áreas costeiras rasas). Essa partição do habitat pode indicar filopatria e explicar a estrutura genética, mesmo para espécies altamente cursoriais (Duncan *et al.*, 2006). As arraias da família Potamotrygonidae são vivíparas e possivelmente apresentam criadouros. Juvenis capturados para pesca ornamental são capturados somente em águas rasas como igapós (obs. pess.). Os resultados de estrutura genética obtidos neste trabalho foram obtidos por marcador genético transmitido exclusivamente por fêmeas (DNA mitocondrial). Assim pode ser que somente as fêmeas das espécies analisadas nesse estudo sejam filopátricas, talvez associadas aos locais de reprodução. Existem evidências de segregação sexual para espécies de *Potamotrygon*, (M.L.G. Araújo, com. pess.) e o padrão de dispersão dos machos dessa espécie só poderá ser avaliado geneticamente com a utilização de marcadores genéticos nucleares ou do cromossomo sexual masculino.

2.5.3 Variabilidade genética intrapopulacional

A variabilidade genética dentro das populações de *P. motoro* para ambos os índices calculados π e h foi mais baixa que a encontrada para outros vertebrados aquáticos da bacia

Amazônica (Pearse *et al.*, 2006), notadamente a diversidade nucleotídica (π). Entretanto esse valor é similar ao de tubarões marinhos (e.g. Graves, 1998; Duncan *et al.*, 2006). A taxa de substituição de genes mitocondriais de cartilaginosos é de sete a oito vezes mais lento que em primatas ou ungulados, provavelmente devido a menores taxas metabólicas (Martin *et al.*, 1992). Apesar dessa baixa variabilidade média, três populações se destacam pela pouca variabilidade (Solimões 1, Tarauacá e Caraurai, Fig. 19). Interessantemente essas três populações encontram-se em locais onde o provável lago Pebas uma vez existiu do Mioceno até provavelmente o Plioceno (Capítulo 1). Esse padrão pode estar refletindo uma expansão geográfica de *P. motoro* no sentido leste-oeste, talvez no início da diversificação original, conforme sugerido pela análise NCA no nível hierárquico mais abrangente. Entretanto, os testes de expansão populacional F_s e D para Caraurai não foram significativos e não foi possível calculá-los para as duas outras localidades devido ao monomorfismo dos haplótipos. A não detecção de expansão populacional nesse caso pode ter sido artefato de uma expansão antiga de um subgrupo de haplótipos, sendo que a proporção entre diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) já tenham atingido equilíbrio local entre mutação e deriva genética. A menor variabilidade nessas localidades pode ser devido a uma colonização mais recente quando comparada a idade total da linhagem *P. motoro* (ainda que antiga a ponto de ter alcançado equilíbrio genético local) aliado ao baixo fluxo gênico entre as populações, que preveniu o estabelecimento de níveis de variabilidade genética similar ao de outras populações.

2.5.4 Conclusão

Os resultados do presente estudo indicam que dentro do complexo *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* existe uma forte associação entre haplótipos e geografia,

sendo identificadas pelo menos cinco linhagens evolutivas distintas (*P. orbignyi* do rio Tapajós; *P. scobina* da baía de Marajó; *P. orbignyi* do rio Aripuanã; *P. orbignyi* do rio Negro e *P. motoro* do rio Purus). Muitas dessas linhagens apresentam padrões de cor distintos de *P. motoro* e são chamadas de *P. orbignyi*. Entretanto, as espécies classificadas aqui de *P. orbignyi* não formam um grupo monofilético, mas representam padrões replicados de padrão de cor em diferentes localidades geográficas, mais proximamente relacionadas a *P. motoro*.

Segundo o Conceito de Coesão de Espécie (Templeton, 1989), para essas linhagens evolutivas serem consideradas espécies-coesas é necessário a demonstração da ausência de permutabilidade genética e/ou ecológica, o que parece ser o caso para algumas dessas linhagens (por exemplo, *P. orbignyi* do rio Negro apresenta diferenças na coloração, dentição e dieta quanto à *P. motoro* do rio Negro, Araújo, comm. Pessoal).

A extensa variação de cor encontrada no que é chamado de *P. orbignyi* em diferentes localidades (obs. pess.) pode estar relacionada a adaptações aos ambientes em que ocorrem. Subdivisão populacional influencia o potencial evolutivo de uma espécie, *i.e.* a habilidade de uma espécie para evoluir e se adaptar a uma mudança ambiental (Allendorf & Luikart, 2006). Populações sem subdivisão teriam tão alto fluxo gênico que a adaptação local não seria possível. Entretanto foi encontrado que *P. motoro* apresenta fluxo gênico muito baixo entre populações, e provavelmente as diferenças morfológicas e de coloração encontradas em *P. orbignyi* reflitam adaptação e diferenciação local entre populações distintas (de *P. motoro* ou outro grupo ancestral) levando à evolução paralela de morfotipos similares.

O complexo *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* provavelmente se originou muito recentemente (há, no máximo, 2 milhões de anos), indicado pela pequena divergência genética e extensivo compartilhamento de haplótipos entre essas espécies. A espécie ancestral do complexo provavelmente se originou mais recentemente que a transposição do Arco do Purus pelo ancestral do grupo roseta-ocelado (Capítulo 1), passando por um processo de expansão

geográfica colonizando toda a bacia amazônica, Orinoco e possivelmente outras bacias não analisadas nesse estudo (Parnaíba, Paraguai-Paraná, Uruguai). Provavelmente com as oscilações climáticas do Pleistoceno, o nível das águas dos rios da bacia Amazônica oscilaram ciclicamente. *P. motoro*, uma espécie que ocorre nos canais dos grandes rios, ou a espécie ancestral do grupo, provavelmente colonizou tributários, incluindo regiões à montante de falhas geológicas dos escudos da Guiana e Central em épocas em que o volume das águas estava alto e posteriormente, com a baixa das águas, as populações ficaram relativamente isoladas e algumas embarreiradas por cachoeiras, podendo ter dado origem a outras espécies do grupo roseta-ocelado (Capítulo 1). Esses processos explicam a expansão observada no mais alto nível dos clados da análise NCA, que é o evento mais antigo e posteriormente a diversificação por colonização/fragmentação e fluxo gênico restrito, o que é observado nos clados mais recentes. Esse modelo é corroborado pela radiação encontrada na filogenia do grupo roseta-ocelado e a existência de espécies de *Potamotrygon* endêmicas das regiões acima de falhas geológicas.

A distribuição geográfica de *P. motoro* estende-se por uma enorme região, caracterizada por diferenças pronunciadas de estações seca/chuvosa; e bacias que variam no seu substrato geológico, carga de sedimentos e produtividade biológica (Goulding *et al.*, 2003). O pequeno fluxo gênico entre populações de *P. motoro*, e, provavelmente, *P. orbingnyi* e *P. scobina* devido ao baixo poder de dispersão possivelmente faz com que adaptações locais (pela Seleção Natural) à miríade de ambientes a que essas populações estão expostas ao longo da distribuição geográfica da espécie, se mantenham restritas geograficamente. A Seleção Natural pode dirigir a evolução ao isolamento reprodutivo entre duas populações mesmo que elas residam em habitats idênticos em situados em diferentes localidades (Coyne & Orr, 2004). Isso deve-se ao fato de que seleção é aleatória, e adaptação a uma mesma variável ambiental pode se dar por meio de mutações em locais diferentes do genoma das populações.

Assim, a grande variabilidade de morfotipos (notavelmente padrões de coloração) encontrada em *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina*, algumas vezes convergindo para padrões similares de coloração (e.g. *P. orbignyi* dos rios Tapajós, Negro, Tarauacá) provavelmente se deve a uma combinação de fluxo gênico restrito entre as populações, associado com Seleção Natural aos ambientes locais. Esse processo pode ter sido/ser importante na diversificação das espécies de arraias-de-água-doce da família Potamotrygonidae, além dos já citados eventos vicariantes, como por exemplo, o isolamento devido à cachoeiras.

CAPÍTULO 3

Teste da utilidade do DNA *barcoding* na radiação do gênero de arraias de água doce do gênero *Potamotrygon* (Potamotrygonidae: Myliobatiformes)

3.1 INTRODUÇÃO

O consórcio mundial *Consortium for the Barcode of Life* foi criado com o objetivo de desenvolver o DNA *barcoding* como padrão global (<http://barcoding.si.edu>). O objetivo do DNA *barcoding* é usar um ou mais genes para *i*) relacionar espécimes de posição taxonômica desconhecida em uma espécie e *ii*) aumentar a descoberta de novas espécies (Moritz & Cicero, 2004). Os proponentes argumentam que existem um extraordinário número de espécies não descritas e o número de taxonomistas tradicionais é muito pequeno para lidar com essa diversidade; espécies morfologicamente crípticas são subestimadas por métodos morfológicos tradicionais e; estágios larvais de alguns grupos de espécies frequentemente não podem ser designadas à espécie correta baseado em morfologia (Hebert *et al.*, 2003). O DNA *barcoding* supostamente seria um método rápido, eficiente e acessível globalmente para delimitar e identificar novas espécies. O gene mitocondrial citocromo *c* oxidase I (COI) foi escolhido como gene padrão para o DNA *barcoding* por possuir seqüência de aminoácidos conservada, o que permite uma ampla aplicabilidade de *primers* em diversos organismos e aparentemente funciona bem para discriminar espécies (Hebert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006).

Há dois pressupostos básicos que permeiam a metodologia do DNA *barcoding*. Primeiro, o monofiletismo das espécies em respeito ao marcador molecular usado, de forma a permitir o posicionamento correto de um espécime à sua espécie; e, segundo, a variabilidade genética intraespecífica é muito menor que a diferença genética entre espécies, justificando o uso de limiares (*thresholds*) que funcionariam como um determinado valor de diferença

genética a partir do qual um dado indivíduo seria posicionado em uma dada espécie ou seria considerado representante de uma espécie nova (Hebert *et al.*, 2003).

Entretanto, críticos do DNA *barcoding* argumentam que esses estudos não compararam espécies irmãs, os principais candidatos a compartilhar haplótipos e mostrar pequena diferença genética interespecífica. Adicionalmente, porque esses estudos não amostraram a diversidade dentro da distribuição geográfica das espécies, *i.e.*, os estudos atuais de DNA *barcoding* tendem a subestimar a variabilidade intraespecífica (Moritz & Cicero, 2004). De fato, Johnson e Cicero (2004) encontraram resultados que contrastam diametralmente àqueles de Hebert *et al.* (2004) quando comparadas espécies irmãs de aves da América do Norte. Eles encontraram valores de diferença genética média interespecífica muito menores e variabilidade genética intraespecífica muito maiores que aqueles encontrados por Hebert *et al.* (2004), e também encontraram muitos casos de parafilia (*incomplete lineage sorting*).

No presente estudo, nós testamos a eficiência do gene mitocondrial COI para delimitar espécies de arraia de água doce da família Potamotrygonidae, usando a metodologia proposta pelo *Consortium for the Barcode of Life*. Para isso, foi gerada a primeira hipótese compreensiva das relações filogenéticas intrafamiliares da família e também foi avaliada a diversidade genética intraespecífica das espécies amostradas. Foram pesquisadas 10 das 18 espécies válidas, usando um segmento de 522pb do gene COI para inferir as relações filogenéticas dentro da família e testar hipóteses filogenéticas alternativas. Posteriormente, foi testada a utilidade da metodologia DNA *barcoding* nessa família, por meio de: *i*) avaliação do monofiletismo recíproco das espécies e *ii*) da comparação entre divergência interespecífica e variabilidade intraespecífica, como forma de testar a validade do uso de marcos genéticos (*thresholds*), para relacionar espécimes em uma espécie e identificar novas espécies.

OBJETIVOS

3.2.1 *Objetivo geral*

Testar o gene mitocondrial COI para delimitar espécies de arraias de água doce da família Potamotrygonidae, usando a metodologia proposta pelo *Consortium for the Barcode of Life*.

3.2.2 *Objetivos Especificos*

- Sequenciar o gene mitocondrial COI para espécies de arraias de água doce da família Potamotrygonidae;
- Inferir relações filogenéticas dentro da família Potamotrygonidae;
- Avaliar a diversidade genética intraespecífica e;
- Testar a utilidade do DNA *barcoding* nessa família.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Amostragem

Foram amostradas seis espécies válidas e duas não descritas do gênero *Potamotrygon*, com ao menos dois indivíduos por espécie, para um total de 36 espécimes (Tabela 7). Foram analisadas as espécies *Potamotrygon motoro* (n=10), *P. orbignyi* (n=6), *P. scobina* (n=2), *P. leopoldi* (n=2), *P. falkneri* (n=3), *P. schroederi* (n=3), *Potamotrygon* sp.aff. *schroederi* (n=1), *Potamotrygon* sp.2 (n=4) e *Potamotrygon* sp.1 (n=5). Em amostragem no rio Caura, Venezuela foi capturado espécime que foi chamado de *Potamotrygon* sp. aff. *schroederi*, assim classificado pela proximidade genética com *P. schroederi* do rio Negro e porque essa espécie foi descrita originalmente como pertencente à bacia do rio Orinoco (Rosa, 1985b). *Potamotrygon* sp.1 é endêmica do rio Negro, Bacia Amazônica, e é bem caracterizada tanto morfológica quanto ecologicamente (Araújo, 1998), mas ainda não foi descrita cientificamente. *Potamotrygon* sp.2 apresenta um padrão de cor relativamente semelhante à *P. motoro* porém característico, e apresenta distribuição restrita à montante das cachoeiras do rio Tapajós, acima da cidade de Itaituba. Também foram incluídas seqüências do gene mitocondrial COI de *P. henlei* e *Plesiotrygon iwamae* obtidas de Marques (2000). Como grupo externo foram incluídos o tubarão *Heterodontus francisci* e as espécies de arraia-de-ferrão da ordem Myliobatiformes *Hexatrygon bickelli* e *Himantura pacifica*. Seqüências de *Heterodontus francisci* e *Hexatrygon bickelli* foram obtidas do GenBank. Seqüência de *Himantura pacifica* foi obtida Marques (2000). O gênero *Himantura* é considerado o taxon irmão mais provável de Potamotrygonidae (Lovejoy, 1996; McEachran *et al.*, 1996; Lovejoy *et al.*, 1998; Dunn *et al.*, 2003 mas ver Carvalho 2004).

Tabela 9. Espécies analisadas para DNA *barcoding* e localidades de coleta.

Espécie	N	Local de coleta	Unidade política	Coordenadas
<i>Potamotrygon motoro</i>	10	Rio Aripuanã	AM, Brasil	06°00'S, 60°12'W
		Lago Janauacá	AM, Brasil (n=2)	03°28'S, 60°17'W
		Rio Parguaza	AP, Venezuela	06°24'N, 67°10'W
		Rio Juruá	AM, Brasil (n=3)	04°51'S, 66°51'W
		Rio Jarauá	AM, Brasil	02°76'S, 64°88'W
		Rio Itu	AM, Brasil	00°29'S, 63°15'W
		Rio Demini	AM, Brasil	00°47'S, 62°56'W
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	6	Rio Demini	AM, Brasil (n=2)	00°31'S, 62°53'W
		Rio Aripuanã	AM, Brasil (n=4)	06°07'S, 60°13'W
<i>Potamotrygon scobina</i>	2	Rio Pará	PA, Brasil	00°54'S 48°17'W
		Rio Aripuanã	AM, Brasil	06°07'S, 60°13'W
<i>Potamotrygon leopoldi</i>	2	Rio Xingu	PA, Brasil	03°15'S, 52°04'W 03°34'S, 51°52'W
<i>Potamotrygon falkneri</i>	3	Rio Paraná	MS, Brasil	20°45'S, 51°40'W
<i>Potamotrygon schroederi</i>	3	Rio Demini	AM, Brasil	00°46'S, 62°56'W
<i>Potamotrygon</i> sp. aff. <i>schroederi</i>		Rio Caura	BO, Venezuela	06°50'S, 64°47'W
<i>Potamotrygon</i> sp.1	5	Rio Aiuanã	AM, Brasil (n=2)	00°52'S, 65°15'W
		Rio Itu	AM, Brasil (n=3)	00°27'S, 63°37'W
<i>Potamotrygon</i> sp. 2	4	Rio Tapajós	PA, Brasil	04°33'S, 56°15'W
<i>Potamotrygon henlei</i>	1	Rio Tocantins	-	Marques (2000)
<i>Plesiotrygon iwamae</i>	1	Rio Solimões	-	Marques (2000)
<i>Himantura pacifica</i>	1	-	-	Marques (2000)
<i>Hexatrygon bickelli</i>	1	-	-	GenBank: NC_007230
<i>Heterodontus francisci</i>	1	-	-	GenBank: NC_003137
Total	41			

3.3.2 Extração de DNA, amplificação e seqüenciamento

Os DNA nuclear e mitocondriais foram extraídos de tecido muscular preservado em álcool 100% pelo protocolo padrão de Sambrook *et al.* (1989). Foi amplificado o gene mitocondrial COI pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* COIf 5'-CTGCAGGAGGAGAYCC-3' (*forward*) e COIa 5'-AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC-3' (*reverse*) descrito por Palumbi and Benzie (1991). As reações de PCR foram realizadas em um volume de reação de 25 µl, contendo 2,5µl de dNTPs (10mM); 2,5µl de tampão 10X (100mMTris-HCL, 500mM KCl); 2µl de cada *primer* (2µM), 3µl de MgCl₂ (25mM); 1µl de DNA (ca. 10ng) e 1U da DNA polimerase *Taq*. Os ciclos de amplificação foram realizados como segue: 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto; anelamento a 52 °C por 35 segundos; e extensão a 72 °C por 90 segundos. Uma extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose a 1%. O produto de PCR foi purificado com o kit *GFXTM PCR DNA Kit* (*Amersham Bioscience*), e diluído em 20µl de tampão de diluição. O *primer foward* usado na amplificação do gene COI também foi usado na reação de sequenciamento. Os ciclos da reação de sequenciamento foram realizados a 52 °C seguindo protocolo recomendado pelo fabricante do kit *ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare). Os ciclos de reação de sequenciamento foram realizados num volume final de 10µl contendo 4µl de DNA, 2µl de *primer* a 0,2µM; 2µl de tampão suprido pelo kit *ET* e 2µl do *mix ET*. Os produtos amplificados do ciclo de seqüência foram precipitados usando a precipitação padrão por acetato de amônio/etanol. Posteriormente esses produtos foram ressuspensos em formamida Hi-Di e resolvidas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

3.3.3 Alinhamento das seqüências

As seqüências foram alinhadas no programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1996) usando as configurações padrão e editadas manualmente. Clustal W é implementado no programa BioEdit (Hall, 1999). Sítios variáveis foram checados no programa MEGA 3.0 (Kumar *et al.*, 2004) e o alinhamento completo foi traduzido em aminoácidos. O segmento de 522 pares de base do gene COI não resultou em nenhum códon de parada inesperado.

3.3.4 Análise filogenética e teste de hipóteses

Análises filogenéticas sob os critérios ótimos de *Neighbor-Joining* (NJ), *Maximum-likelihood* (ML) e *Bayesian-likelihood* (BL) foram realizados no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). A metodologia NJ é o método padrão de inferência filogenética em estudos de DNA *barcoding* (Hebert *et al.*, 2003); seu uso em estudos de DNA *barcoding* se dá em parte pela seu histórico em ser apto a rapidamente analisar grande número de *taxa* (Kumar & Gadagkar, 2000). O modelo de substituição escolhido foi o computacionalmente simples Kimura-dois-parâmetros (K2P) que é o modelo padrão de evolução molecular usado em estudos de DNA *barcoding*. A robustez da topologia NJ foi testada usando 2000 replicatas de *bootstrap*.

Foi usado o programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) para determinar o melhor modelo de evolução de seqüências e os seus parâmetros evolutivos para os dados. O modelo de evolução molecular *General Time Reversible* (GTR, Rodríguez *et al.*, 1990), com taxa homogênea, mas com porção dos sítios tratados como invariável foi determinado como modelo mais provável de evolução das seqüências. O modelo GTR + inv de evolução das seqüências foi implementado em análises ML e BL. A topologia ML foi estimada a partir de

25 buscas heurísticas usando adição aleatória de seqüências e implementando o algoritmo *tree bisection and reconnection* (TBR). A robustez estatística da topologia ML foi testada por meio de 200 replicatas de *bootstrap*.

A análise *Bayesian-likelihood* foi realizada no programa MrBayes 3.01 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Os dados foram repartidos em três categorias representando a primeira, segunda e terceira posições do gene COI, cada uma seguindo o modelo de evolução de seqüência GTR + inv. Foram corridas 2.000.000 de gerações usando os parâmetros padrões de cadeias longas e curtas e de aquecimento (*heating*), amostrando árvores e comprimento de ramos a cada 100 gerações. *Log likelihoods* estabilizaram-se nos primeiros 10% de corrida, e portanto foram descartadas as 200.000 árvores iniciais como passos de *burning* na computação da árvore consenso sob a regra de 50% da maioria.

Distâncias par-a-par sob os modelos de evolução molecular Kimura-dois-parâmetros (K2P) e *maximum likelihood* GTR + inv foram gerada no PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002).

Hipóteses filogenéticas alternativas foram testadas sob os critérios de ML e NJ. Quatro hipóteses foram testadas: monofiletismo de *P. motoro*, monofiletismo de *P. orbignyi*, monofiletismo de *P. scobina* e o monofiletismo recíproco das três espécies. Foram encontradas as mais prováveis árvores de NJ que satisfizeram essas restrições, as quais foram comparadas contra a mais provável topologia NJ usando os testes Kishino-Hasegawa (K-H) e Shimodaira-Hasegawa (S-H). (Shimodaira & Hasegawa, 1999). Teste de significância foi realizado usando o *bootstrap* REL (Kishino *et al.*, 1990). Também foi testada a hipótese de que os dados seguem evolução tipo relógio molecular, restringindo as reconstruções filogenéticas à arvores que seguem evolução tipo relógio molecular e testando se essa restrição resulta em hipótese filogenética significativamente menos provável, usando o teste *likelihood-ratio test* (Huelsenbeck & Rannala, 1997).

Para testar se os alelos das espécies estão sob seleção natural, foi usado o teste McDonald-Kreitman (McDonald & Kreitman, 1991) implementado no programa DnaSP 3.1 (Rozas *et al.*, 2003).

A metodologia *barcoding* foi testada por meio da avaliação do monofiletismo recíproco das espécies estudadas e avaliação da relação entre variabilidade genética intraespecífica e divergência genética interespecífica. Os resultados obtidos foram usados para discutir a validade das premissas do *barcoding*.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Análise filogenética

O alinhamento de seqüências de COI compreendeu 522 sítios dos quais 180 foram variáveis e 121 informativos para parcimônia. Dentro de Potamotryonidae, os dados contiveram 111 sítios variáveis e 79 sítios informativos para parcimônia.

Os três métodos de reconstrução filogenética indicaram que as três espécies mais amplamente distribuídas na bacia Amazônica, *P. motoro*, *P. orbignyi*, e *P. scobina*, não são reciprocamente monofiléticas (ML S-H test $p = 0.003$; NJ S-H test $p = 0.009$; Figs. 6, 7 e 9). O monofiletismo das outras espécies, incluindo *Potamotrygon* sp. 1 and *Potamotrygon* sp.2 é estatisticamente bem suportada em todas as análises. As espécies *P. motoro*, *P. orbignyi*, *P. scobina*, *P. leopoldi*, *P. falkneri*, *Potamotrygon* sp.2 e *P. henlei*, daqui para a frente chamadas de clado roseta-ocelado não é resolvido nos três métodos de reconstrução (Figs. 6, 7 e 9). A posição filogenética de *Plesiotrygon iwamae* conflita entre as análises de NJ, ML e BL. Na topologia de NJ, *Plesiotrygon iwamae* aparece como irmã de todas as espécies de *Potamotrygon*, embora essa relação não seja suportada por valores de *bootstrap* (Fig. 9). Nas

árvores geradas pelo critério de ML, *Plesiotrygon iwamae* é irmã de *Potamotrygon schroederi* e *Potamotrygon* sp.1 aparece como espécie irmã da família Potamotrygonidae (Fig. 7). Nas árvores geradas pelo critério de BL, *Plesiotrygon iwamae* aparece agrupada dentro de *Potamotrygon* e *P. schroederi* é a espécie irmã da família (Fig. 6). Os comprimentos dos ramos internos dentro da filogenia de Potamotrygonidae são relativamente curtos, especialmente dentro do clado roseta-ocelado. Análise de Máxima parcimônia não foi realizada uma vez que há múltiplos indivíduos representados pelo mesmo haplótipo o que resulta em um grande número de topologias igualmente parcimoniosas. O consenso dessas topologias igualmente parcimoniosas apresenta o mesmo padrão filogenético observado em outras análises, mas os testes estatísticos não podem ser efetuados eficientemente.

Consistente com as expectativas, as distâncias genéticas par-a-par apresentaram valores similares para espécies proximamente relacionadas, tanto para o modelo de evolução molecular Kimura-dois-parâmetros (K2P) quanto para o modelo *maximum likelihood* GTR + inv. Entretanto, distâncias relativamente menores foram encontradas para espécies distantemente relacionadas sob modelo K2P do que GTR + inv devido à inabilidade do modelo K2P de compensar pela acumulação de mudanças homoplásicas em divergências filogenéticas mais profundas (Tabela 8).

Tabela 10. Distâncias entre espécies do grupo externo e média de Potamotrygonidae, sob o modelo de evolução K2P and GTR + inv.

	K2 Distance	ML Distance
<i>Himantura</i> X Potamotrygonidae	0,177127	0,270009
<i>Hexatrygon</i> X Potamotrygonidae	0,221816	0,399065
<i>Heterodontus</i> X Potamotrygonidae	0,222407	0,434164

Distâncias genéticas entre as espécies *P. motoro*, *P. scobina* e *P. orbigny* não podem ser consideradas medidas reais de divergência já que essas espécies não são reciprocamente monofiléticas. Devido à ausência de monofiletismo recíproco, as distâncias genéticas intraespecíficas dentro dessas espécies mostram níveis similares de divergências entre as medidas de distância genética (Tabelas 8 e 9).

Tabela 11. Distâncias genéticas, máxima e mínima, entre espécies usando modelo de substituição K2P. Em negrito, distâncias entre os taxa polifiléticos (sensu Funk & Omland, 2003) *Potamotrygon motoro*, *P. scobina* e *P. orbignyi*. Sobre a linha de separação está a variabilidade intraespecífica. Notar que a distância em negrito está dentro do espectro de variabilidade intraespecífica e não pode ser usada para discriminar espécies.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1	<i>Himantura pacifica</i>	min	*												
		max	*												
2	<i>Hexatrygon bickelli</i>	min	0.21571	*											
		max	0.21571	*											
3	<i>Heterodontus francisci</i>	min	0.24499	0.23618	*										
		max	0.24499	0.23618	*										
4	<i>Potamotrygon</i> sp.1	min	0.17137	0.21119	0.22852	0.00000									
		max	0.17137	0.21119	0.22852	0.00000									
5	<i>Potamotrygon scobina</i>	min	0.16130	0.2139	0.23171	0.05652	0.01359								
		max	0.16380	0.22209	0.23728	0.06297	0.01359								
6	<i>Potamotrygon motoro</i>	min	0.16380	0.21661	0.23171	0.05866	0.00385	0.00000							
		max	0.17118	0.24373	0.23937	0.07572	0.03350	0.03147							
7	<i>Potamotrygon henlei</i>	min	0.17354	0.22436	0.23127	0.06926	0.02747	0.02546	*						
		max	0.17354	0.22436	0.23127	0.06926	0.02949	0.03954	*						
8	<i>Potamotrygon orbignyi</i>	min	0.16130	0.21661	0.22620	0.05652	0.00000	0.00192	0.02546	0.00192					
		max	0.16865	0.23016	0.23984	0.06514	0.01950	0.03549	0.0335	0.01751					
9	<i>Plesiotrygon iwamae</i>	min	0.20114	0.20563	0.23034	0.09735	0.09508	0.09508	0.09708	0.09735	*				
		max	0.20114	0.20563	0.23034	0.09735	0.09735	0.11072	0.09708	0.10408	*				
10	<i>Potamotrygon</i> sp. aff. <i>motoro</i>	min	0.17629	0.23577	0.22641	0.06938	0.02751	0.02550	0.03147	0.02550	0.10408	0.00000			
		max	0.17629	0.23577	0.22641	0.06938	0.02954	0.03959	0.03147	0.02949	0.10408	0.00000			
11	<i>Potamotrygon schroederi</i>	min	0.16923	0.21437	0.21804	0.09126	0.07807	0.07807	0.08449	0.08254	0.10624	0.08016	0.00000		
		max	0.16923	0.21437	0.22346	0.09126	0.08931	0.09796	0.09354	0.09600	0.10624	0.08915	0.00772		
12	<i>Potamotrygon leopoldi</i>	min	0.16631	0.23043	0.23171	0.06732	0.02555	0.02353	0.02546	0.02353	0.09963	0.02954	0.08254	0.00578	
		max	0.16884	0.23043	0.23728	0.06951	0.02959	0.03965	0.02747	0.02954	0.09963	0.03157	0.09617	0.00578	
13	<i>Potamotrygon falkneri</i>	min	0.21437	0.22486	0.22894	0.06951	0.03368	0.03368	0.03560	0.03368	0.10887	0.03979	0.08931	0.04194	0.00000
		max	0.21985	0.22486	0.06951	0.06951	0.03573	0.04379	0.03560	0.04186	0.10887	0.03979	0.09848	0.04403	0.00000

Tabela 12. Distâncias genéticas máxima e mínima entre espécies usando modelo de substituição GTR + inv. Notar que as distâncias genéticas entre espécies mais distantemente relacionadas tendem a ser maiores que as distâncias dadas pelo modelo de substituição K2P. O modelo de substituição GTR + inv é mais complexo, e corrige melhor para substituições múltiplas em sítios nucleotídicos.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>Himantura pacifica</i>	min *												
		max *												
2	<i>Hexatrygon bickelli</i>	min 0.36039	*											
		max 0.36039	*											
3	<i>Heterodontus francisci</i>	min 0.48298	0.51363	*										
		max 0.48298	0.51363	*										
4	<i>Potamotrygon sp.1</i>	min 0.26358	0.35694	0.41983	0.00000									
		max 0.26358	0.35694	0.41983	0.00000									
5	<i>Potamotrygon scobina</i>	min 0.26033	0.38597	0.41221	0.06078	0.01384								
		max 0.26033	0.38737	0.42460	0.06823	0.01384								
6	<i>Potamotrygon motoro</i>	min 0.24875	0.39116	0.42093	0.06341	0.00387	0.00000							
		max 0.26676	0.44773	0.45796	0.08589	0.03558	0.03336							
7	<i>Potamotrygon henlei</i>	min 0.27669	0.42223	0.45371	0.07865	0.02979	0.02766	*						
		max 0.27669	0.42223	0.45371	0.07865	0.03212	0.04445	*						
8	<i>Potamotrygon orbignyi</i>	min 0.23774	0.38737	0.41221	0.06078	0.00000	0.00193	0.02767	0.00193					
		max 0.25798	0.41301	0.43947	0.07130	0.02026	0.03137	0.03710	0.01828					
9	<i>Plesiotrygon iwamae</i>	min 0.35266	0.38315	0.49989	0.11505	0.11358	0.1136	0.12176	0.11578	*				
		max 0.35266	0.38315	0.49989	0.11505	0.11578	0.13901	0.12176	0.12734	*				
10	<i>Potamotrygon sp. aff. motoro</i>	min 0.27973	0.41943	0.41095	0.07734	0.02906	0.02696	0.03503	0.02697	0.1277	0.00000			
		max 0.27973	0.41095	0.07734	0.07734	0.03135	0.04348	0.03503	0.03152	0.1277	0.00000			
11	<i>Potamotrygon schroederi</i>	min 0.25546	0.38833	0.41654	0.10454	0.08812	0.08814	0.10008	0.09339	0.12883	0.09216	0.00000		
		max 0.25547	0.39262	0.42063	0.10455	0.10079	0.11578	0.11118	0.11113	0.12885	0.10293	0.00780		
12	<i>Potamotrygon leopoldi</i>	min 0.24636	0.40410	0.42701	0.07343	0.02649	0.02444	0.02775	0.02444	0.11998	0.03145	0.09510	0.00587	
		max 0.25238	0.41228	0.43396	0.07624	0.03099	0.04294	0.03008	0.03115	0.12280	0.03379	0.10987	0.00587	
13	<i>Potamotrygon falkneri</i>	min 0.25665	0.40817	0.42450	0.07628	0.03540	0.03541	0.03922	0.03541	0.13176	0.04293	0.10136	0.04485	0.00000
		max 0.25665	0.40817	0.42450	0.07628	0.03750	0.04764	0.03922	0.04493	0.13176	0.04293	0.11204	0.04734	0.00000

3.4.2 Teste de hipóteses

O teste de hipóteses das topologias ML e NJ usando a abordagem de Kishino-Hasegawa (1989) e Shimodaira-Hasegawa (1999) resultou em essencialmente as mesmas conclusões (Tabelas 11 e 12). O monofiletismo de *Potamotrygon motoro* não foi estatisticamente rejeitado na topologia ML (teste K-H, $P = 0,057$; S-H, test $P = 0,078$) e foi apenas rejeitado pelo teste K-H na topologia NJ (teste K-H, $P = 0,034$; S-H test, $P = 0,123$). O monofiletismo de *P. orbignyi* foi rejeitado para ambos os testes nas topologias ML (teste K-H $P = 0,022$; S-H test $P = 0,017$) e NJ (teste K-H $P = 0,010$; S-H test $P = 0,011$). Da mesma forma, o monofiletismo de *P. scobina* foi rejeitado na topologia ML pelo teste K-H, mas não para o teste S-H (teste K-H, $P = 0,037$; teste S-H, $P = 0,059$) e rejeitado para ambos os testes na topologia NJ (teste K-H, $P = 0,013$; teste S-H, $P = 0,037$). Forçando o monofiletismo recíproco das três espécies resultou em hipóteses filogenéticas significativamente piores tanto sob o critério ML (teste K-H, $P = 0,003$; teste S-H, $p = 0,003$) quanto estimativa filogenética NJ teste K-H, $P = 0,009$; teste S-H, $P = 0,009$).

Resultados do teste McDonald-Kreitman indicaram que a seleção natural está atuando ou atuou em *P. orbignyi* ($P < 0,05$), embora no geral os dados das seqüências evoluem de forma similar a relógio (teste LTR, $P > 0,05$).

Tabela 13. Resultados dos testes de restrição ML para aferir monofiletismo das espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina*. * $P < 0.05$

Tipo de topologia	-ln L	Diff -ln L	Teste KH	TesteSH
			<i>P</i>	<i>P</i>
Topologia não restrita	2267,274	(best)		
Monofiletismo de <i>P. motoro</i>	2287,596	20,32163	0,057	0,078
Monofiletismo de <i>P. orbignyi</i>	2293,598	26,32365	0,022*	0,017*
Monofiletismo de <i>P. scobina</i>	2287,120	19,84637	0,037*	0,059
Monofiletismo recíproco de <i>P. motoro</i> , <i>P. orbignyi</i> and <i>P. scobina</i>	2318,833	51,55882	0,003*	0,003*

Tabela 14. Resultados dos testes de restrição NJ para aferir monofiletismo das espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina*. * $P < 0.05$

Tipo de topologia	-ln L	Diff -ln L	Teste KH	TesteSH
			<i>P</i>	<i>P</i>
Topologia não restrita	2270,696	(best)		
Monofiletismo de <i>P. motoro</i>	2289,381	18,68517	0,034*	0,123
Monofiletismo de <i>P. orbignyi</i>	2297,192	26,49593	0,010*	0,011*
Monofiletismo de <i>P. scobina</i>	2293,614	22,91805	0,013*	0,037*
Monofiletismo recíproco de <i>P. motoro</i> , <i>P. orbignyi</i> and <i>P. scobina</i>	2322,812	52,11596	0,009*	0,009*

3.5 DISCUSSÃO

Potamotrygonidae é a única família da classe Chondrichthyes que é completamente adaptada a viver em ambientes de água doce (Thorson *et al.*, 1983). Vários estudos filogenéticos tais como Rosa (1985b), Lovejoy (1996), Lovejoy e colaboradores (1998), Marques (2000) e Carvalho *et al.* (2004b) almejaram testar o monofiletismo dessa família, inferir as relações filogenéticas entre os três gêneros descritos e estabelecer o seu grupo irmão. Esses estudos suportaram o monofiletismo de Potamotrygonidae e a maioria concluiu que a colonização da água doce da América do Sul é resultado de um único evento de colonização. A maioria dos autores também considerou que o gênero marinho *Himantura* é a espécie irmã de Potamotrygonidae (mas ver Carvalho *et al.*, 2004b). A relação dentro de Potamotrygonidae foi hipotetizada como *Paratrygon* (*Plesiotrygon* (*Potamotrygon*))) embora Marques (2000) e Quijada (2003) encontraram *Plesiotrygon* agrupado dentro de *Potamotrygon*. A primeira tentativa de definir a relação entre as espécies do gênero *Potamotrygon* foi feita por Marques (2000) embora esse estudo tenha se baseado em poucos espécimes por espécie, as espécies não foram amostradas ao longo de suas distribuições geográficas. Esse desenho amostral assume que as espécies são monofiléticas em respeito ao locus estudado, e que elas mostram ausência de, ou muito pouca, variação intraespecífica (Funk & Omland, 2003). Por sua vez, esses pressupostos requerem que as espécies nominais estudadas representem linhagens reprodutivas e genéticas independentes, cujos limites tenham sido acuradamente identificados por taxonomistas e cuja árvore reconstruída seja aproximações acuradas da história dos organismos, *i.e.* árvores de espécies (Funk & Omland, 2003). Entretanto, esse cenário não acomoda espécies que são parafiléticas ou polifiléticas, casos extensamente reportados na literatura (Funk & Omland, 2003e referências lá contidas). Monofiletismo não recíproco de espécies pode, por exemplo, ser causado pela retenção de polimorfismo ancestral ou

introgressão após evento de hibridização (Avice, 2000; Moritz & Cicero, 2004). Na análise filogenética do presente estudo foram amostradas quatro espécies em ao menos duas localidades diferentes, e a maioria das espécies são representadas por ao menos quatro indivíduos.

3.5.1 *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon scobina* e *Potamotrygon orbignyi*

Foi encontrado que três das quatro espécies com mais ampla distribuição geográfica na bacia Amazônica (a quarta espécie, *Paratrygon aiereba*, não foi incluída nesse estudo), e que apresentam um grande polimorfismo no padrão de coloração, não foram reciprocamente monofiléticos (teste ML S-H, $P = 0.003$; teste NJ S-H, $P = 0,009$; Tabelas 10 e 11, Figs. 6, 7 e 9), e compartilham haplótipos extensivamente. Compartilhamento de haplótipos pode indicar que *i)* a validade taxonômica dessas espécies deve ser reconsiderada *ii)* as linhagens não tiveram tempo suficiente para alcançar monofiletismo recíproco; *iii)* hibridização; ou *iv)* uma combinação desses fatores (Moritz & Cicero, 2004).

Os resultados filogenéticos são consistentes com a possibilidade de que essas espécies podem, na verdade, representar uma única espécie altamente policromática, com ampla distribuição geográfica dentro da bacia Amazônica. Existe sobreposição de alguns caracteres morfométricos e merísticos (Rosa, 1985b; Carvalho *et al.*, 2003), embora Rosa (1985b) mediu, em sua maioria, espécimes juvenis; e também grande quantidade de variação de coloração e padrão dentro de *P. scobina* da baía de Marajó (Almeida, 2003) e de *P. orbignyi* do rio Tocantins (Rincon, 2006) e *P. scobina* de várias localidades da bacia amazônica (Araújo e Toffoli. obs. pess.). Entretanto, vários caracteres morfológicos tem sido aventados para separar essas espécies (Rincon, 2006). Diferenças entre *P. scobina* e *P. orbignyi* incluem

presença/ausência de sulcos labiais (Almeida, 2003), cor da porção ventral da cauda, cúspide dos dentes e padrão dorsal de coloração (Rincon, 2006).

Outra hipótese é que *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* são espécies evolutivas verdadeiras e *P. motoro* é seu ancestral. Embora não-monofiléticas, pouco compartilhamento de haplótipos entre localidades geográficas de *P. scobina* e *P. orbignyi* ocorre, e ambas as espécies estão agrupadas dentro de *P. motoro*. *Potamotrygon scobina* e *P. orbignyi* podem estar em processo de especiação incipiente com limites de espécies não muito bem definidos. A seleção observada agindo em *P. orbignyi* suporta esse cenário. A posição taxonômica de *P. motoro*, *P. scobina* e *P. orbignyi* é mais aprofundadamente discutida no capítulo 2.

3.5.2 Relações filogenéticas dentro do clado roseta-ocelado – “A radiação”

As relações filogenéticas entre as espécies do clado roseta-ocelado não são resolvidas. Com exceção das três espécies discutidas acima, o monofiletismo de todas as outras espécies é bem suportado, mas não há suporte estatístico para as relações filogenéticas entre elas. Esse padrão sugere que o clado roseta-ocelado passou, ou ainda está passando, por um processo de radiação filogenética, um rápido aumento no número de espécies (Schluter, 2000). Uma assinatura filogenética desse processo é geralmente uma politomia, devido ao extremamente curto período evolutivo que separa sucessivos eventos de especiação. Isso impede a acumulação de caracteres sinapomórficos nos ramos internos da árvore filogenética, culminando na falha de todo e qualquer método filogenético em reconstruir uma topologia bifurcada estatisticamente suportada. Alguns exemplos de radiação incluem a radiação Cambriana (Philippe *et al.*, 1994; Bromham *et al.*, 1998; Conway-Morris, 1999), lagartos *Anolis* do Caribe (Jackman *et al.*, 1999), peixes ciclédos dos lagos do leste da África (Avice, 1990; Turner *et al.*, 2001) e peixes scianídeos do Atlântico oeste (Vinson *et al.*, 2004).

3.5.3 Enraizando *Potamotrygonidae*

Na topologia NJ, *Plesiotrygon iwamae* aparece como irmã de todas as espécies de *Potamotrygon* (Fig. 9). Na filogenia ML, *Plesiotrygon iwamae* é irmã de *Potamotrygon schroederi*, e *Potamotrygon* sp.1 aparece como espécie basal da família *Potamotrygonidae* (Fig. 7). Na filogenia BL, *Plesiotrygon iwamae* aparece agrupada dentro de *Potamotrygon* com *Potamotrygon schroederi* sendo espécie basal da família (Fig. 6). O enraizamento de NJ e ML não são suportados por valores de *bootstrap*.

A despeito desses conflitos, a topologia não-enraizada do grupo interno, entre *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon schroederi*, *Potamotrygon* sp.1 e o clado roseta-ocelado mantém-se a mesma entre os três métodos de inferência filogenética (Fig. 18). O posicionamento correto da raiz é especialmente difícil em filogenias com ramos internos relativamente curtos, enraizados por um grupo externo distantemente relacionado ou altamente divergente. Um exemplo clássico envolve o posicionamento correto da raiz das aves, cujos parentes mais próximos são os crocódilios, distantemente relacionados, e vice versa (Mindell *et al.*, 1999; García-Moreno & Mindell, 2000).

A distância de ML média dentro de *Potamotrygonidae* é de 5.9%, enquanto a distância de ML média observada entre *Potamotrygonidae* e seu grupo irmão *Himantura* é de 27%, e mais alta em relação às outras espécies do grupo externo (Tabela 10).

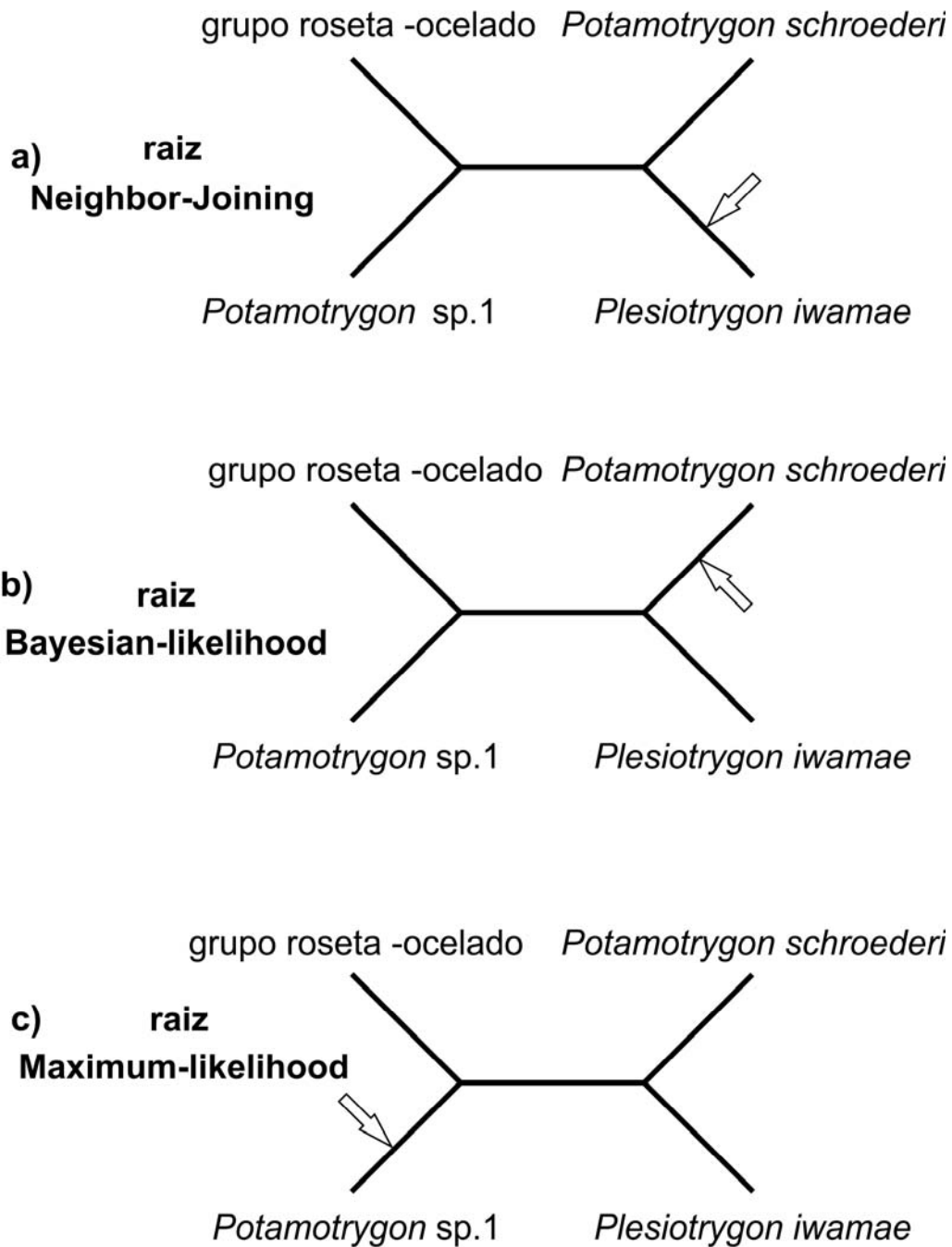


Figura 21. Representação esquemática da topologia do grupo interno que é a mesma para os três métodos de inferência filogenética. Setas representam pontos de enraizamento das diferentes análises a) raiz *Neighbor-joining*; b) raiz *Bayesian-likelihood*; c) raiz *Maximum-likelihood*. Ver texto para discussão.

A posição filogenética de *Plesiotrygon iwamae* como espécie-irmã de *Potamotrygon* inferida por NJ (Fig. 9) é a menos provável e mostra baixo suporte de *bootstrap*. *Plesiotrygon iwamae* também possui uma taxa de evolução molecular relativamente rápida quando comparada às espécies de *Potamotrygon* (ver comprimento do ramo que leva a *Plesiotrygon* nas filogenias geradas pelos métodos MV e BL), e o uso de um modelo simples de evolução de seqüência (K2P) aumenta mais esse problema. *Plesiotrygon iwamae* é, portanto susceptível a artefatos de “atração por ramos longos (*long branch attraction*) e o método NJ de reconstrução filogenética tem desempenho relativamente pior quando comparado com métodos ML em minimizar os efeitos desses artefatos (Huelsenbeck & Hillis, 1993; Hillis *et al.*, 1994). Isso me leva a concluir que *Plesiotrygon iwamae* é filogeneticamente agrupado dentro de *Potamotrygon*, uma hipótese já sugerida por Marques (2000) e Quijada (2003).

3.5.4 DNA Barcoding

Estudos suportando o DNA *barcoding* frequentemente não compara espécies irmãs, que são os candidatos naturais a compartilhar haplótipos (Moritz & Cicero, 2004). Assumindo que *Potamotrygon motoro*, *P. scobina* e *P. orbignyi* sejam espécies válidas, na forma de grupos evolutivos, os resultados aqui apresentados mostram que o uso de seqüências de DNA para posicionar espécimes desconhecidos a qualquer dessas três espécies iria invariavelmente falhar, uma vez que essas três espécies compartilham haplótipos. Um posicionamento correto só seria possível com a adição de outros tipos de dados como caracteres morfológicos e ecológicos, ou mesmo dados sobre freqüência de haplótipos, caso exista uma distribuição não-aleatória de haplótipos ao longo da distribuição geográfica. Metodologias como a do DNA *barcoding*, que se baseia somente em um tipo de dado e critério, irá inevitavelmente ter taxas mais altas de falha que aquelas que incorporam mais informação.

Assumindo que a amostragem do presente estudo seja representativa da diversidade genética presente nas demais espécies analisadas, as espécies pesquisadas (*Potamotrygon* sp. 1, *P. schroederi*, *P. leopoldi*, *P. sp. 2*, *P. falkneri*) formam grupos monofiléticos e bem suportados separados por distâncias genéticas razoavelmente grandes em relação a variabilidade genética intraespecífica (*Plesiotrygon iwamae* e *Potamotrygon henlei* apresentam $n=1$ e assim, não é possível inferir monofiletismo). Esse padrão permitiria o uso de filogenia do gene COI para designar espécimes desconhecidos em suas espécies corretamente, como proposto pelo *Consortium for the Barcode of Life*, por meio do estabelecimento de um valor de *threshold* de distância genética para a família Potamotrygonidae. Entretanto, essas espécies foram coletadas em pontos geográficos relativamente próximos, o que pode ter limitado a amostragem da variabilidade genética dessas espécies e, assim, a relativa grande distância genética entre espécies, em comparação com a variabilidade intraespecífica, pode ser um artefato de coleta. Essas espécies também apresentam distribuições geográficas menores que *Potamotrygon motoro*, *P. scobina* e *P. orbignyi* e, portanto, menores tamanhos populacionais totais, e conseqüentemente, uma provável menor variabilidade genética intraespecífica (Hamrick & Godt, 1990; Hamrick & Godt, 1996), o que proporcionaria uma relativa grande diferença entre distância genética entre espécies e variabilidade intraespecífica, justificando o uso de *thresholds* para designar espécimes a uma dessas espécies.

O posicionamento do espécime do rio Caura, Venezuela, e espécimes do rio Negro, Brasil, na espécie *P. schroederi* é um exemplo ilustrativo. Como reconhecido morfológicamente, *P. schroederi* ocorre tanto na bacia do rio Negro como do rio Orinoco (Rosa, 1985b), e as análises do presente estudo indicam que o espécime da Venezuela é irmã dos espécimes do rio Negro, separados por 0,8% de divergência das seqüências. Para algumas espécies, a divisão das bacias Negro/Orinoco representa uma forte barreira para o fluxo

gênico, com espécies-irmãs ocorrendo em cada lado da divisão. Eu tive acesso somente à foto do espécime do rio Caura e o padrão de cor é muito diferente quando comparado com animais do rio Negro. Divergência genética de 0,8% é relativamente baixa quando comparada a diferença média de 2,5% entre as espécies do clado roseta-ocelado, e levaria muitos taxonomistas a indicar que os peixes do Caura e Negro representem uma única espécie. Entretanto, eu também não amostréi todas as espécies da família e, portanto não sei com certeza que os peixes dos rios Negro e Caura formam clados irmãos, ou que exista divergência menor que 2,5% para outros pares de espécie. Portanto, não posso nem aceitar ou nem recusar que *P. schroederi* ocorrendo em cada lado da divisão das bacias Negro/Orinoco represente mais que uma espécie. Esses resultados levantam sérios questionamentos quanto à confiança exclusiva na metodologia do DNA *barcoding* em identificar espécies, ao menos para as arraias de água doce da família Potamotrygonidae.

Assumindo que as espécies sejam bem caracterizadas, monofiléticas e que a divergência intraespecífica é muito menor que a divergência interespecífica, critérios que só podem ser verificados por amostragem e análise de populações ao invés da amostragem topológica (um ou poucos espécimes representando a espécie) correntemente predominante, DNA *barcoding* pode ser poderoso em posicionar espécimes desconhecidos em espécies. Entretanto o DNA *barcoding* não é poderoso em descobrir novas espécies usando os métodos propostos de *thresholds*, conforme Hebert *et al.* (2003). Por exemplo, em um amplo estudo sobre a adoção de valores de *thresholds* para três grupos amplamente amostrados de moluscos, Meyer e Paulay (2005) encontraram uma sobreposição significativa da variabilidade genética intraespecífica e distância genética interespecífica, dando forte evidência contra a adoção de *thresholds*. Mais além, o uso de *thresholds* implicitamente assume que seqüências moleculares evoluem à maneira de relógio. Apesar de não ter sido possível rejeitar o modo de evolução molecular tipo-relógio nos dados de COI de

potamotrigonídeos, evolução molecular tipo-relógio é raro em todos os grupos de organismos (para uma revisão, ver Li, 1997) o que resultou no desenvolvimento de vários algoritmos especificamente levando em conta esse fato no cálculo dos tempos de divergência (Sanderson, 1997; Sanderson, 2002; Thorne & Kishino, 2002).

O problema fundamental do uso de *thresholds* está no fato de que espécies são grupos naturais submetidos a processos naturais. Espécies estão sujeitas a processos demográficos e seletivos que atuarão no aumento ou diminuição da diversidade genética e profundidade de coalescência de espécies individuais (p.ex. Avise, 2000; Hey, 2001a; Coyne & Orr, 2004). Espécies podem não ser morfologicamente distintas de outras espécies, porém geneticamente distintas (e.g. Hrbek *et al.*, 2006), e inversamente, espécies podem ser morfologicamente distintas sem ser geneticamente distintas (e.g. Verheyen *et al.*, 2003; Duda Jr. & Rolán, 2005). Espécies são grupos evolutivos reais e não categorias que são criadas como função direta da percepção humana. (Hey, 2001a). Espécies não são o mesmo que categorias definidas por critério tal como quantidade de divergência de seqüência. Portanto uso de *thresholds* na descoberta de novas espécies é por demais simplista, enganador e inválido.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Consortium for the Barcode of Life (CBOL) <http://barcoding.si.edu/>

Achenbach GM, Achenbach SVM (1976) Notas acerca de algunas especies de raya fluvial (Batoidei, Potamotrygonidae), que frecuentam el sistema hidrografico del Rio Parana Medio en el Departamento La Capital. *Comunicaciones del Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino* **8**, 3-34.

Allendorf FW, Luikart G (2006) *Conservation and the Genetics of Populations* Blackwell Publishing, New York, NY.

Almeida MP (2003) *Pesca, Policromatismo e Aspectos Sistemáticos de Potamotrygon scobina, Garman 1913 Chondrichthyes: Potamotrygonidae da Região da Ilha de Colares da Ilha de Marajó - Pará* M.Sc., Universidade Federal do Pará & Museu Paraense Emílio Goeldi.

Araújo MLG (1998) *Biologia Reprodutiva e Pesca de Potamotrygon sp. C (Chondrichthyes - Potamotrygonidae), no Médio Rio Negro, Amazonas* M.Sc., Universidade Federal do Amazonas & Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Awise JC (1990) Flocks of African fishes. *Nature* **347**, 512-513.

Awise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species* Harvard University Press, Cambridge, MA.

Bromham L, Rambaut A, Fortey R, Cooper A, Penny D (1998) Testing the Cambrian explosion hypothesis by using a molecular dating technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12386-12389.

Carvalho MR, Lovejoy NR, Rosa RS (2003) Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (eds. Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ), pp. 22-28. Edipucrs, Porto Alegre.

- Carvalho MR, Maisey JG, Grande L (2004a) Freshwater stingrays of the Green River formation of Wyoming (early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **284**, 1-136.
- Carvalho MRd, Maisey JG, Grande L (2004b) Freshwater stingrays of the Green River formation of Wyoming (early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **284**, 136.
- Castex MN (1964) Estado actual de los estudios sobre la raya fluvial neotropical. *Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino" Cincuentenario del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino"*, 9-49.
- Castex MN, Maciel I, Achenbach GM (1963) Acerca de la raya fluvial *P. labradori*. *Neotropica (La Plata)* **9**, 117-121.
- Cegelski C, Waits L, Anderson N (2003) Assessing population structure and gene flow in Montana wolverines (*Gulo gulo*) using assignment-based approaches. *Molecular Ecology* **12**, 2907-2918.
- Charvet-Almeida P (2001) *Ocorrência, Biologia e Uso das Raias de Água Doce na Baía de Marajó (Pará, Brasil), com Ênfase na Biologia de Plesiotrygon iwamae (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)*. M.Sc., Universidade Federal do Pará & Museu Paraense Emílio Goeldi.
- Charvet-Almeida P (2006) *Historia Natural e Conservação das Raias de Água Doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no Médio Rio Xingu, Área de Influência do Projeto Hidrelétrico de Belo Monte (Pará, Brasil)* Ph.D., Universidade Federal da Paraíba.

- Charvet-Almeida P, Almeida MP (2004) Sub-estudo Elasmobrânquios: contribuição ao conhecimento, distribuição e desafios para a conservação dos elasmobrânquios (raias e tubarões) no sistema Solimões / Amazonas. Pró-Várzea / IBAMA, Museu Paraense Emílio Goeldi & Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa, Belém, PA.
- Charvet-Almeida P, Araújo MLG, Rosa RS, Rincón G (2002) Neotropical Freshwater Stingrays: diversity and conservation status. *Shark News* **14**.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1659.
- Compagno LJV, Cook SF (1995) The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. In: *The Biology of Freshwater Elasmobranchs, a Symposium to Honor Thomas B. Thorson* (eds. Oettinger MI, Zorzi GD), pp. 62-90. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences* vol. 7.
- Conway-Morris S (1999) *The Crucible of Creation: The Burgess Shale and the Rise of Animals* Oxford University Press, New York, NY.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation* Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Cracraft J (1983) Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* **1**, 159-187.
- de Thoisy B, Hrbek T, Farias IP, Vasconcelos WR, Lavergne A (2006) Genetic structure and population dynamics of Black caiman (*Melanosuchus niger*). *Biological Conservation* **accepted**.
- Duda Jr. TF, Rolán E (2005) Explosive radiation of Cape Verde *Conus*, a marine species flock. *Molecular Ecology* **14**, 267-272.
- Duncan KM, Martin AP, Bowen BW, De Couet HG (2006) Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology* **15**, 2239-2251.

- Dunn KA, McEachran JD, Honeycutt RL (2003) Molecular phylogenetics of myliobatiform fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with comments on the effects of missing data on parsimony and likelihood. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**, 259-270.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Farias IP, Da Silveira R, de Thoisy B, *et al.* (2004) Genetic diversity and population structure of Amazonian crocodylians. *Animal Conservation* **7**, 265-272.
- Felsenstein J (1978) Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* **27**, 401-411.
- Franzinelli E, Igreja H (2002) Modern sedimentation in the Lower Negro River, Amazonas State, Brazil. *Geomorphology* **44**, 259-271.
- Fu Y-X (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915-925.
- Funk DJ, Omland KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics* **34**, 397-423.
- García-Moreno J, Mindell DP (2000) Rooting a phylogeny with homologous genes on opposite sex chromosomes (gametologs): A case study using avian CHD. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 1826-1832.
- Garman S (1913) The Plagiostomia (sharks, skates, and rays). *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College* **36**, 1-515.
- Goulding M, Barthem R, Ferreira EJG (2003) *The Smithsonian Atlas of the Amazon* Smithsonian Institution Press, Washington, DC.

- Graves JE (1998) Molecular insights into the population structure of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity* **89**, 427-437.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 968-971.
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
- Hamrick JL, Godt MJ (1990) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources* (eds. Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS), pp. 43-63. Sinauer, Sunderland.
- Hamrick JL, Godt MJ (1996) Conservation genetics of endemic plants. In: *Conservation Genetics: Case Histories from Nature* (eds. Avise JC, Hamrick JL), pp. 281-304. Chapman & Hall, New York.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **270**, 313-321.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* **2**, 1657-1663.
- Hey J (2001a) *Genes, Categories and Species: The Evolutionary and Cognitive Causes of the Species Problem* Oxford University Press, New York, NY.
- Hey J (2001b) The mind of the species problem. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 326-329.
- Hillis DM, Huselsenbeck JP, Cunningham CW (1994) Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science* **264**, 671-677.

- Hrbek T, Farias IP, Crossa M, *et al.* (2005a) Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation* **8**, 297-308.
- Hrbek T, Keivany Y, Coad BW (2006) New species of *Aphanius* (Teleostei, Cyprinodontidae) from Isfahan province of Iran and a reanalysis of other Iranian species. *Copeia* **2006**, 244-255.
- Hrbek T, Taphorn DC, Thomerson JE (2005b) Molecular phylogeny of *Austrofundulus* Myers (Cyprinodontiformes: Rivulidae), with revision of the genus and the description of four new species. *Zootaxa* **825**, 1-39.
- Huelsenbeck JP, Hillis DM (1993) Success of phylogenetic methods in the four-taxon case. *Systematic Biology* **42**, 247-264.
- Huelsenbeck JP, Rannala B (1997) Phylogenetic methods come of age: Testing hypotheses in an evolutionary context. *Science* **276**, 227-232.
- Huelsenbeck JP, Ronquist FR (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**, 754-755.
- Jackman TR, Larson A, de Queiroz K, Losos JB (1999) Phylogenetic relationships and tempo of early diversification in *Anolis* lizards. *Systematic Biology* **48**, 254-285.
- Johnson NK, Cicero C (2004) New mitochondrial DNA data affirm the importance of Pleistocene speciation in North American birds. *Evolution* **58**, 1122-1130.
- Junior VH (2005) Ocorrência de arraias da família Potamotrygonidae no rio Paraná e relato da presença no rio Tietê: resultados preliminares. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia* **78**, 3.
- Kishino H, Hasegawa M (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *Journal of Molecular Evolution* **29**, 170-179.

- Kishino H, Miyata T, Hasegawa M (1990) Maximum likelihood inference of protein phylogeny and the origin of chloroplasts. *Journal of Molecular Evolution* **30**, 151-160.
- Kumar S, Gadagkar SR (2000) Efficiency of the neighbour-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *Journal of Molecular Evolution* **51**, 544-553.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150-163.
- Li W-H (1997) *Molecular Evolution* Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Lovejoy NR (1996) Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society* **117**, 207-257.
- Lovejoy NR, Bermingham E, Martin AP (1998) Marine incursion into South America. *Nature* **396**, 421-422.
- Lovejoy NR, de Araújo MLG (2000) Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorrhaphis*. *Molecular Ecology* **9**, 259-268.
- Lundberg JG, Marshall LG, Guerrero J, *et al.* (1998) The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (eds. Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS), pp. 13-48. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- Maddison W (1989) Reconstructing character evolution on polytomous cladograms. *Cladistics* **5**, 365-378.
- Marques FPL (2000) *Evolution of neotropical freshwater stingrays and their parasites: taking into account space and time* Ph.D., University of Toronto.

- Martin AP, Naylor GJP, Palumbi SR (1992) Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature* **357**, 153-155.
- McDonald JH, Kreitman M (1991) Adaptive protein evolution at Adh locus in *Drosophila*. *Nature* **351**, 652-654.
- McEachran JD, Dunn KA, Miyake T (1996) Interrelationships within the batoid fishes (Chondrichthyes: Batoidea). In: *Interrelationship of Fishes* (eds. Stiassny MLJ, Parenti LR, Johnson GD), pp. 63-84. Academic Press, New York, NY.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* **3**, 2229-2238.
- Mindell DP, Sorenson MD, Dimcheff DE, *et al.* (1999) Interordinal relationships of birds and other reptiles based on whole mitochondrial genomes. *Systematic Biology* **48**, 138-152.
- Molnar P (2004) Late Cenozoic increase in accumulation rates of terrestrial sediment: How might climate change have affected erosion rates? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **32**, 67-89.
- Moritz C, Cicero C (2004) DNA barcoding: Promises and pitfalls. *PLoS Biology* **2**, 1529-1534.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics* Columbia University Press, New York, NY.
- Nishida K (1990) Phylogeny of the suborder Myliobatidoidei. *Memoires of the Faculty of Fisheries Hokkaido University* **37**, 1-108.
- Palumbi SR, Benzie J (1991) Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **1**, 27-34.
- Pearse DE, Arndt AD, Valenzuela N, *et al.* (2006) Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population

- genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology* **15**, 985-1006.
- Philippe H, Chenuil A, Adoutte A (1994) Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny? *Development* **1994 Supplement**, 15-25.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2000) GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* **9**, 487-488.
- Rannala B, Yang Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* **43**, 304-311.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rincon GF (2006) *Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce Potamotrygon orbignyi (Castelnau) (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no rio Paranã-Tocantins* Ph.D., Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".
- Rodríguez FJ, Oliver JL, Marín A, Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* **142**, 485-501.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572-1574.
- Rosa RS (1985a) *A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)* Ph.D., The College of William and Mary.
- Rosa RS (1985b) *A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)*. Faculty of the school of marine Science the college of William and Mary.

- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messenguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition edn. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY.
- Sanderson M (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 1218-1231.
- Sanderson MJ (2002) Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 101-109.
- Santos MCF, Ruffino ML, Farias IP (2007) High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology* **71**, 1-12.
- Schluter D (2000) *The Ecology of Adaptive Radiation* Oxford University Press, Oxford, England.
- Shimodaira H, Hasegawa M (1999) Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 1114-1116.
- Sioli H (1984) The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses and river types. In: *The Amazon. Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin* (ed. Sioli H), pp. 127-165. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sites Jr. JW, Marshall JC (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 462-470.
- Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), Beta Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. *Genetics* **105**, 437-460.

- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.
- Templeton AR (1989) The meaning of species and speciation: A genetic perspective. In: *Speciation and its Consequences* (eds. Otte D, Endler JA), pp. 3-27. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Templeton AR (1995) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping or DNA sequencing. V. Analysis of case/control sampling designs: Alzheimer's disease and the apoprotein E locus. *Genetics* **140**, 403-409.
- Templeton AR (2001) Using phylogenetic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology* **10**, 779-791.
- Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* **13**, 789-809.
- Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF (1987) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* **117**, 343-351.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data: III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**, 619-633.
- Templeton AR, Sing CF (1993) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping: IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* **134**, 659-669.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1996) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position

- specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Thorne JL, Kishino H (2002) Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data. *Systematic Biology* **51**, 689-702.
- Thorson TB, Brooks DR, Mayes MA (1983) The evolution of freshwater adaptation in stingrays. *National Geographic Society Research Reports* **15**, 663-694.
- Toffoli D, Hrbek T, Araújo MLG, *et al.* (2006) A test of the utility of 'barcoding' in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Genetics and Molecular Biology*.
- Turner GF, Seehausen O, Knight ME, Allender CJ, Robinson RL (2001) How many species of cichlid fishes are there in African lakes? *Molecular Ecology* **10**, 793-806.
- Vasconcelos WR, Hrbek T, Da Silveira R, *et al.* (2006) Population genetic analysis of *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758) from South America. *Genetics and Molecular Biology* **21**, 220-230.
- Verheyen E, Salzburger W, Snoeks J, Meyer A (2003) Origin of the superflock of cichlid fishes from Lake Victoria, East Africa. *Science* **300**, 325-329.
- Vinson C, Gomes G, Schneider H, Sampaio I (2004) Sciaenidae fish of the Caeté River estuary, Northern Brazil: mitochondrial DNA suggests explosive radiation for the Western Atlantic assemblage. *Genetics and Molecular Biology* **27**, 174-180.
- Waples RS, Gustafson RG, Weitkramp LA, *al. e* (2001) Characterizing diversity in salmon from the Pacific Northwest. *Journal of Fish Biology* **59**, 1-41.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B* **360**, 1-11.
- Wiens JJ, Penkrot TA (2002) Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* **51**, 69-91.

Wiley EO, Siegel-Causey D, Brooks DR, Funk VA (1991) *The Compleat Cladist: A Primer of Phylogenetic Procedures* University of Kansas, Lawrence, KS.

Willis SC (2006) *Diversification in the Neotropical cichlid genus Cichla (Perciformes: Cichlidae)* M.Sc., University of Manitoba.

Willis SC, Nunes MS, Montaña CG, Farias IP, Lovejoy NR (2007) Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **in press**.

ANEXO I

ESPÉCIMES ESTUDADOS E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA

Abaixo provido os espécimes amostrados separados por espécie; número de acesso na Coleção de tecidos do LEGAL; as coleções zoológicas onde espécimes estão depositados; número de campo (N); localidades; ponto georreferenciado de coleta (em graus e décimos de graus); segmento do DNAm nesse estudo (ATP inicial = 500pb, ATP interno = 280pb, COI = 522pb). Apenas espécimes com seqüências dos fragmentos inicial e interno foram utilizados na análise NCA. Abreviações são: MLG (série de campo de Maria Lúcia Góes de Araújo); MPA (série de campo de Maurício Pinto de Almeida); PCA (série de campo de Patrícia Charvet-Almeida); INPA (Coleção Ictiológica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Espécimes e informações não coletados indicados pelo símbolo –.

Espécie	ID	Coleção	N	localidade	tributário	Latitude	Longitu de	ATPase inicial	ATPase interno	COI
<i>Paratrygon aieireba</i>	7	MLG	[8] 22/12/01	igarapé Zamula	rio Negro	-0.876	-62.784	X		
<i>P. aieireba</i>	9	MLG	[10] 22/12/01	igarapé Zamula	rio Negro	-0.876	-62.784	X		
<i>P. aieireba</i>	10	MLG	[12] 22/12/01	igarapé Zamula	rio Negro	-0.876	-62.784	X		
<i>P. aieireba</i>	12	MLG	[14] 22/12/01	igarapé Zamula	rio Negro	-0.876	-62.784	X		
<i>P. aieireba</i>	15	MLG	[6] 27/01/02	Daraquá	rio Negro	-0.504	-63.215	X		
<i>P. aieireba</i>	18	MLG	[10] 27/01/02	Daraquá	rio Negro	-0.504	-63.215	X		
<i>P. aieireba</i>	22	MLG	[8] 29/12/01	rio Cazurucú	rio Negro	-0.504	-63.215	X		
<i>P. aieireba</i>	37	MLG	[5] 06/02/03	rio Cuinuní	rio Negro	-0.754	-63.104	X		
<i>P. aieireba</i>	42	MLG	[2] 11/01/04	igarapé Zamula	rio Negro	-0.859	-62.769	X		
<i>P. aieireba</i>	43	MLG	[3] 11/01/04	igarapé Zamula	rio Negro	-0.859	-62.769	X		
<i>P. aieireba</i>	65	MLG	[5] 14/01/04	rio Cazurucú	rio Negro	-0.430	-63.368	X		
<i>P. aieireba</i>	66	MLG	[6] 14/01/04	rio Cazurucú	rio Negro	-0.430	-63.368	X		
<i>P. aieireba</i>	153	INPA	[14] 10/9/04	rio Aripuanã	rio Negro	-6.010	-60.200	X		
<i>Plesiotrygon iawamae</i>	462	INPA	[1]1/11/05	boca Janauacá	rio Solimões	-	-	X		
<i>Potamotrygon falkneri</i>	436	-	[1] 1/9/05	lago Jupia	rio Paraná	-20.750	-51.667	X		X
<i>P. falkneri</i>	437	-	[2] 1/9/05	lago Jupia	rio Paraná	-20.750	-51.667	X		X
<i>P. falkneri</i>	438	-	[3] 1/9/05	lago Jupia	rio Paraná	-20.750	-51.667	X		
<i>P. falkneri</i>	442	-	[7] 1/9/05	lago Jupia	rio Paraná	-20.750	-51.667	X		X
<i>P. falkneri</i>	443	-	[8] 1/9/05	lago Jupia	rio Paraná	-20.750	-51.667	X		
<i>P. falkneri</i>	444	-	[9] 1/9/05	lago Jupia	rio Paraná	-20.750	-51.667	X		
<i>P. falkneri</i>	445	-	[10] 1/9/05	lago Jupia	rio Paraná	-20.750	-51.667	X		
<i>Potamotrygon leopoldi</i>	194	PCA	[B-138]	ilha de Izaltino	rio Xingu	-3.443	-52.199	X		X
<i>Potamotrygon motoro</i>	14	MLG	[5] 27/01/02	Daraquá	rio Negro	-0.504	-63.215	X	X	
<i>P. motoro</i>	16	MLG	[7] 27/01/02	Daraquá	rio Negro	-0.504	-63.215	X	X	
<i>P. motoro</i>	17	MLG	[8] 27/01/02	Daraquá	rio Negro	-0.504	-63.215	X	X	
<i>P. motoro</i>	24	MLG	[15] 29/12/01	rio Cazurucu	rio Negro	-0.504	-63.215	X	X	
<i>P. motoro</i>	25	MLG	[17] 29/12/01	rio Cazurucu	rio Negro	-0.504	-63.215	X	X	
<i>P. motoro</i>	26	MLG	[1] 30/12/01	ilha do mulufu	rio Negro	-0.504	-63.215	X	X	
<i>P. motoro</i>	28	MLG	[1] 06/02/03	rio Cuinuní	rio Negro	-0.754	-63.104	X	X	
<i>P. motoro</i>	30	MLG	[3] 05/02/03	rio Ararirrá	rio Negro	-0.458	-63.618	X	X	

Espécie	ID	Coleção	N	localidade	tributário	Latitude	Longitu de	ATPase inicial	ATPase interno	COI
<i>P. motoro</i>	31	MLG	[1] 05/02/03	rio Ararirrá	rio Negro	-0.458	-63.618	X	X	
<i>P. motoro</i>	34	MLG	[2] 04/02/03	rio Ararirrá	rio Negro	-0.458	-63.618	X	X	
<i>P. motoro</i>	35	MLG	[1] 04/02/03	rio Ararirrá	rio Negro	-0.458	-63.618	X	X	
<i>P. motoro</i>	48	MLG	[1] 13/01/04	Pente	rio Negro	-0.494	-63.258	X	X	
<i>P. motoro</i>	49	MLG	[2] 13/01/04	Pente	rio Negro	-0.494	-63.258	X	X	
<i>P. motoro</i>	50	MLG	[3] 13/01/04	Pente	rio Negro	-0.494	-63.258	X	X	
<i>P. motoro</i>	52	MLG	[4] 13/01/04	Pente	rio Negro	-0.494	-63.258	X	X	
<i>P. motoro</i>	74	MLG	[14] 14/01/04	rio Cazuruucu	rio Negro	-0.430	-63.368	X	X	
<i>P. motoro</i>	78	MLG	[2] 03/02/04	Daraqúá	rio Negro	-0.486	-63.257	X	X	
<i>P. motoro</i>	79	MLG	[3] 03/02/04	Daraqúá	rio Negro	-0.486	-63.257	X	X	
<i>P. motoro</i>	80	MLG	[4] 03/02/04	Daraqúá	rio Negro	-0.486	-63.257	X	X	X
<i>P. motoro</i>	82	MLG	[5] 03/02/04	Daraqúá	rio Negro	-0.486	-63.257	X	X	
<i>P. motoro</i>	97	MLG	[1] 9/4/04	rio Demini	rio Negro	-0.723	-62.928	X	X	
<i>P. motoro</i>	99	MLG	[2] 9/4/04	rio Demini	rio Negro	-0.723	-62.928	X	X	
<i>P. motoro</i>	102	MLG	[3] 23/2/04	rio Demini	rio Negro	-0.700	-62.910	X	X	
<i>P. motoro</i>	105	MLG	[2] 24/2/04	rio Demini	rio Negro	-0.798	-62.911	X	X	
<i>P. motoro</i>	107	MLG	[10] 24/2/04	rio Demini	rio Negro	-0.774	-62.941	X	X	
<i>P. motoro</i>	117	MLG	[pm] 1/7/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	X
<i>P. motoro</i>	118	MLG	[pm1] 1/7/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	119	MLG	[pm2] 1/7/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	120	MLG	[pm4] 1/7/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	X
<i>P. motoro</i>	121	MLG	[pm5] 1/7/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	122	MLG	[pm6] 1/7/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	123	MLG	[pm7] 1/7/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	124	MLG	[pm8] 1/7/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	129	MLG	[1] 28/8/04	igarapé Aduiá	rio Negro	-0.448	-63.319	X	X	
<i>P. motoro</i>	130	MLG	[2] 28/8/04	igarapé Aduiá	rio Negro	-0.448	-63.319	X	X	
<i>P. motoro</i>	131	MLG	[3] 28/8/04	igarapé Aduiá	rio Negro	-0.448	-63.319	X	X	
<i>P. motoro</i>	132	MLG	[4] 28/8/04	igarapé Aduiá	rio Negro	-0.448	-63.319	X	X	
<i>P. motoro</i>	134	MLG	[2] 29/8/04	rio Demini	rio Negro	-0.706	-62.909	X	X	
<i>P. motoro</i>	135	MLG	[3] 29/8/04	rio Demini	rio Negro	-0.706	-62.909	X	X	
<i>P. motoro</i>	136	-	[1] 3/8/04	-	rio Solimões	-3.582	-61.016	X	X	
<i>P. motoro</i>	140	INPA	[1] 7/9/04	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.019	-60.209	X	X	X
<i>P. motoro</i>	141	INPA	[2] 7/9/04	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.019	-60.209	X	X	X
<i>P. motoro</i>	142	INPA	[3] 7/9/04	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.019	-60.209	X	X	
<i>P. motoro?</i>	143	INPA	[4] 7/9/04	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.019	-60.209	X	X	
<i>P. motoro</i>	154	Winnipeg	[505] 10/1/04	rio Parguaza	Venezuela	6.406	-67.168	X	X	X
<i>P. motoro</i>	156	-	[1] 16/11/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	157	-	[2] 16/11/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	160	-	[5] 16/11/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	161	-	[6] 16/11/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	163	MLG	[1] julho/04	lago Maués	Maués	-3.416	-57.699	X	X	
<i>P. motoro</i>	165	MLG	[1] 18/8/04	-	rio Tapajós	-2.324	-55.024	X	X	
<i>P. motoro</i>	182	MLG	[1] 29/10/04	rio Demini	rio Negro	-0.594	-62.894	X	X	
<i>P. motoro</i>	184	MLG	[3] 29/10/04	rio Demini	rio Negro	-0.594	-62.894	X	X	
<i>P. motoro</i>	185	MLG	[4] 29/10/04	rio Demini	rio Negro	-0.769	-62.941	X	X	
<i>P. motoro</i>	190	MLG	[6] 30/10/04	Rio Demeni	rio Negro	-0.532	-62.896	X	X	
<i>P. motoro</i>	201	-	[4] 11/04	-	rio Juruá	-4.850	-66.850	X	X	X
<i>P. motoro</i>	202	-	[5] 11/04	-	rio Juruá	-4.850	-66.850	X	X	
<i>P. motoro</i>	203	-	[6] 11/04	-	rio Juruá	-4.850	-66.850	X	X	X
<i>P. motoro</i>	204	-	[7] 11/04	-	rio Juruá	-4.850	-66.850	X	X	
<i>P. motoro</i>	205	-	[8] 11/04	-	rio Juruá	-4.850	-66.850	X	X	
<i>P. motoro</i>	206	-	[9] 11/04	-	rio Juruá	-4.850	-66.850	X	X	
<i>P. motoro</i>	207	-	[10] 11/04	-	rio Juruá	-4.850	-66.850	X	X	X
<i>P. motoro</i>	214	MLG	[4] 23/1/05	Bafuana	rio Negro	-0.472	-63.434	X	X	
<i>P. motoro</i>	234	MLG	[4] 16/1/05	Ilha da Mariana	rio Negro	-0.677	-63.059	X	X	
<i>P. motoro</i>	242	MLG	[7] 2/2/05	rio Cuiuni	rio Negro	-0.902	-63.222	X	X	
<i>P. motoro</i>	248	MLG	[11] 2/2/05	rio Cuiuni	rio Negro	-0.772	-63.094	X	X	
<i>P. motoro</i>	249	MLG	[13] 2/2/05	rio Cuiuni	rio Negro	-0.902	-63.222	X	X	
<i>P. motoro</i>	250	MLG	[14] 2/2/05	rio Cuiuni	rio Negro	-0.769	-63.094	X	X	

Espécie	ID	Coleção	N	localidade	tributário	Latitude	Longitu de	ATPase inicial	ATPase interno	COI
<i>P. motoro</i>	251	MLG	[15] 2/2/05	rio Cuiuní	rio Negro	-0.749	-63.107	X	X	
<i>P. motoro</i>	254	MLG	[2] 3/2/05	rio Ararirrá	rio Negro	-0.463	-63.666	X	X	
<i>P. motoro</i>	255	MLG	[3] 3/2/05	rio Ararirrá	rio Negro	-0.463	-63.666	X	X	
<i>P. motoro</i>	256	MLG	[1] 4/2/05	rio Ararirrá	rio Negro	-0.437	-63.663	X	X	
<i>P. motoro</i>	258	MLG	[3] 4/2/05	rio Ararirrá	rio Negro	-0.438	-63.665	X	X	
<i>P. motoro</i>	259	MLG	[4] 4/2/05	rio Ararirrá	rio Negro	-0.438	-63.665	X	X	
<i>P. motoro</i>	261	MLG	[6] 4/2/05	rio Ararirrá	rio Negro	-0.438	-63.665	X	X	
<i>P. motoro</i>	263	MLG	[8] 4/2/05	rio Ararirrá	rio Negro	-0.438	-63.665	X	X	
<i>P. motoro</i>	264	MLG	[9] 4/2/05	rio Ararirrá	rio Negro	-0.438	-63.665	X	X	
<i>P. motoro</i>	266	MLG	[11] 4/2/05	rio Ararirrá	rio Negro	-0.438	-63.665	X	X	
<i>P. motoro</i>	292	-	[61] 12/12/04	RDS Mamirauá	rio Japurá	-2.760	-64.880	X	X	
<i>P. motoro</i>	293	-	[62] 12/12/04	RDS Mamirauá	rio Japurá	-2.760	-64.880	X	X	X
<i>P. motoro</i>	295	-	[100] 13/12/04	RDS Mamirauá	rio Japurá	-2.660	-64.960	X	X	
<i>P. motoro</i>	298	-	[121] 13/12/04	RDS Mamirauá	rio Japurá	-2.660	-64.960	X	X	
<i>P. motoro</i>	299	-	[159]17/12/04	RDS Mamirauá	rio Japurá	-2.710	-65.380	X	X	
<i>P. motoro</i>	308	-	[8] 22/4/05	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	309	-	[9] 22/4/05	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	311	-	[11] 22/4/05	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	313	-	[13] 22/4/05	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. motoro</i>	343	-	[28] 1/6/04	rio Aiuanã	rio Negro	-0.792	-64.985	X	X	
<i>P. motoro</i>	383	INPA	[1] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	384	INPA	[2] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	385	INPA	[8] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	390	INPA	[9] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	391	INPA	[10] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	392	INPA	[11] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	393	INPA	[12] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	394	INPA	[13] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	395	INPA	[14] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	413	INPA	[15] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	414	INPA	[16] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	415	INPA	[17] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	416	INPA	[18] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	417	INPA	[19] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	418	INPA	[20] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	419	INPA	[21] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	420	INPA	[22] 15/9/05	lago Aiapuá	rio Purus	-4.458	-62.200	X	X	
<i>P. motoro</i>	463	MLG	[1] 4/10/05	-	rio Tapajós	-2.284	-55.004	X	X	
<i>P. motoro</i>	464	MLG	[3] 4/10/05	-	rio Tapajós	-2.286	-55.008	X	X	
<i>P. motoro</i>	467	MLG	[6] 4/10/05	-	rio Tapajós	-2.286	-55.010	X	X	
<i>P. motoro</i>	468	MLG	[9] 4/10/05	-	rio Tapajós	-2.290	-55.010	X	X	
<i>P. motoro</i>	469	MLG	[10] 4/10/05	-	rio Tapajós	-2.288	-55.011	X	X	
<i>P. orbigny-jabuti-motoro</i>	470	MLG	[11] 4/10/05	-	rio Tapajós	-2.290	-55.011	X	X	
<i>P. motoro</i>	472	MLG	[1] 5/10/05	-	rio Tapajós	-2.280	-55.006	X	X	
<i>P. motoro</i>	473	MLG	[6] 5/10/05	-	rio Tapajós	-2.284	-55.013	X	X	
<i>P. motoro</i>	474	MLG	[11] 5/10/05	-	rio Tapajós	-2.304	-54.963	X	X	
<i>P. motoro</i>	475	MLG	[10] 5/10/05	-	rio Tapajós	-2.304	-54.963	X	X	
<i>P. motoro</i>	476	MLG	[9] 5/10/05	-	rio Tapajós	-2.304	-54.963	X	X	
<i>P. motoro</i>	477	MLG	[2] 5/10/05	-	rio Tapajós	-2.280	-55.013	X	X	
<i>P. motoro</i>	478	MLG	[7] 5/10/05	-	rio Tapajós	-2.284	-55.013	X	X	
<i>P. motoro</i>	480	MLG	[1_12] 5/10/05	-	rio Tapajós	-2.280	-55.006	X	X	
<i>P. motoro</i>	494	MLG	[2] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.964	-70.664	X	X	
<i>P. motoro</i>	495	MLG	[3] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.964	-70.664	X	X	
<i>P. motoro</i>	500	MLG	[8] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.963	-70.664	X	X	
<i>P. motoro</i>	501	MLG	[9] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.963	-70.664	X	X	
<i>P. motoro</i>	502	MLG	[10] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.963	-70.664	X	X	
<i>P. motoro</i>	504	MLG	[12] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.963	-70.666	X	X	
<i>P. motoro</i>	506	MLG	[14] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.963	-70.666	X	X	
<i>P. motoro</i>	507	PCA	[pvr01]	-	rio Solimões	-3.440	-69.045	X	X	
<i>P. motoro</i>	509	PCA	[pvr09]	-	rio Solimões	-3.651	-64.180	X	X	

Espécie	ID	Coleção	N	localidade	tributário	Latitude	Longitu de	ATPase inicial	ATPase interno	COI
<i>P. motoro</i>	511	PCA	[pvr011]	-	rio Solimões	-3.651	-64.181	X	X	
<i>P. motoro</i>	512	PCA	[pvr12]	-	rio Solimões	-3.651	-64.181	X	X	
<i>P. motoro</i>	513	PCA	[pvr13]	-	rio Solimões	-3.891	-63.420	X	X	
<i>P. motoro</i>	514	PCA	[pvr14]	-	rio Solimões	-3.856	-63.449	X	X	
<i>P. motoro</i>	517	PCA	[pvr22]	-	rio Solimões	-3.576	-60.818	X	X	
<i>P. motoro</i>	518	PCA	[pvr24]	-	rio Solimões	-3.571	-60.818	X	X	
<i>P. motoro</i>	519	PCA	[pvr26]	-	rio Solimões	-3.574	-60.814	X	X	
<i>P. motoro</i>	522	PCA	[pvr34]	-	rio Solimões	-2.062	-55.986	X	X	
<i>P. motoro</i>	524	PCA	[pvr36]	-	rio Solimões	-2.062	-55.987	X	X	
<i>P. motoro</i>	529	PCA	[pvr43]	-	rio Solimões	-2.113	-55.256	X	X	
<i>P. motoro</i>	531	PCA	[pvr46]	-	rio Solimões	-2.484	-54.311	X	X	
<i>P. motoro</i>	537	PCA	[pvr54]	-	rio Solimões	-2.382	-54.079	X	X	
<i>P. motoro</i>	539	PCA	[pvr57]	-	rio Solimões	-2.388	-54.078	X	X	
<i>P. motoro</i>	540	PCA	[pvr58]	-	rio Solimões	-2.388	-54.078	X	X	
<i>P. motoro</i>	542	PCA	[pvr60]	-	rio Solimões	-2.387	-54.070	X	X	
<i>P. motoro</i>	543	PCA	[pvr61]	-	rio Solimões	-2.390	-54.081	X	X	
<i>P. motoro</i>	544	PCA	[pvr62]	-	rio Solimões	-2.388	-54.078	X	X	
<i>P. motoro</i>	546	PCA	[pvr65]	-	rio Solimões	-1.742	-53.165	X	X	
<i>P. motoro</i>	547	PCA	[pvr66]	-	rio Solimões	-1.742	-53.166	X	X	
<i>P. motoro</i>	548	PCA	[pvr67]	-	rio Solimões	-1.742	-53.166	X	X	
<i>P. motoro</i>	549	PCA	[pvr68]	-	rio Solimões	-1.492	-52.461	X	X	
<i>P. motoro</i>	550	PCA	[pvr69]	-	rio Solimões	-1.493	-52.467	X	X	
<i>P. motoro</i>	551	PCA	[pvr70]	-	rio Solimões	-1.496	-52.462	X	X	
<i>P. motoro</i>	552	PCA	[pvr71]	-	rio Solimões	-1.158	-51.771	X	X	
<i>P. motoro</i>	554	PCA	[pvr74]	-	rio Solimões	-0.424	-51.411	X	X	
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	1	MLG	[2] 22/12/01	igarapé Zamula	rio Negro	-0.876	-62.784	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	2	MLG	[3] 22/12/01	igarapé Zamula	rio Negro	-0.876	-62.784	X		
<i>P. orbignyi</i>	3	MLG	[4] 22/12/01	igarapé Zamula	rio Negro	-0.876	-62.784	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	4	MLG	[5] 22/12/01	igarapé Zamula	rio Negro	-0.876	-62.784	X		
<i>P. orbignyi</i>	6	MLG	[7] 22/12/01	igarapé Zamula	rio Negro	-0.876	-62.784	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	19	MLG	[5] 29/12/01	rio Cazurucu	rio Negro	-0.504	-63.215	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	20	MLG	[6] 29/12/01	rio Cazurucu	rio Negro	-0.504	-63.215	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	23	MLG	[9] 29/12/01	rio Cazurucu	rio Negro	-0.504	-63.215	X		
<i>P. orbignyi</i>	38	MLG	[3] 04/03/03	rio Itu	rio Negro	-0.503	-63.245	X		
<i>P. orbignyi</i>	39	MLG	[2] 04/03/03	rio Itu	rio Negro	-0.503	-63.245	X		
<i>P. orbignyi</i>	51	MLG	[3.1] 13/01/04	Pente	rio Negro	-0.494	-63.258	X		
<i>P. orbignyi</i>	54	MLG	[6]13/01/04	Pente	rio Negro	-0.494	-63.258	X		
<i>P. orbignyi</i>	55	MLG	[7] 13/01/04	Pente	rio Negro	-0.494	-63.258	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	61	MLG	[3] 14/01/04	Cazurucu	rio Negro	-0.430	-63.368	X		
<i>P. orbignyi</i>	67	MLG	[7] 14/01/04	rio Cazurucu	rio Negro	-0.430	-63.368	X		
<i>P. orbignyi</i>	68	MLG	[8] 14/01/04	rio Cazurucu	rio Negro	-0.430	-63.368	X		
<i>P. orbignyi</i>	125	-	[p?] 1/7/04	lago Janaucá	rio Solimões	-3.479	-60.285	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	126	-	[pm9] 1/7/04	-	rio Solimões	-3.340	-60.280	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	144	INPA	[5] 7/9/04	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.019	-60.209	X	X	X
<i>P. orbignyi</i>	148	INPA	[9] 9/9/04	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.132	-60.225	X	X	X
<i>P. orbignyi</i>	152	INPA	[13] 10/9/04	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.010	-60.200	X	X	X
<i>P. orbignyi</i>	191	MLG	[11] 30/10/04	rio Demini	Rio Negro	-0.605	-62.896			X
<i>P. orbignyi</i>	192	MLG	[12] 30/10/04	rio Demini	Rio Negro	-0.605	-62.896	X	X	X
<i>P. orbignyi</i>	342	-	[27] 1/6/04	rio Aiuanã	rio Negro	-0.792	-64.985	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	344	-	[29] 2/12/04	rio Aiuanã	rio Negro	-0.773	-64.968	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	346	-	[31] 6/12/04	rio Aiuanã	rio Negro	-0.538	-64.921	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	347	-	[32] 7/12/04	rio Aiuanã	rio Negro	-0.538	-64.921	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	353	-	[38] 1/2/05	rio Aiuanã	rio Negro	-0.531	-64.892	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	354	-	[39] 1/2/05	rio Aiuanã	rio Negro	-0.531	-64.892	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	355	-	[40] 1/2/05	rio Aiuanã	rio Negro	-0.531	-64.892	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	357	-	[42] 1/2/05	rio Aiuanã	rio Negro	-0.531	-64.892	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	358	-	[43] 1/2/05	rio Aiuanã	rio Negro	-0.531	-64.892	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	466	MLG	[5] 4/10/05	rio Tapajós	rio Tapajós	-2.286	-55.007	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	471	MLG	[3] 5/10/05	-	rio Tapajós	-2.280	-55.013	X	X	
<i>P. orbignyi</i>	490	MLG	[2] 11/10/05	rio Tapajós	rio Tapajós	-2.280	-55.006	X	X	

Espécie	ID	Coleção	N	localidade	tributário	Latitude	Longitu de	ATPase inicial	ATPase interno	COI
<i>P. orbigny</i>	493	MLG	[1] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.964	-70.664	X	X	
<i>P. orbigny</i>	496	MLG	[4] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.963	-70.666	X	X	
<i>P. orbigny</i>	497	MLG	[5] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.963	-70.664	X	X	
<i>P. orbigny</i>	498	MLG	[6] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.964	-70.664	X	X	
<i>P. orbigny</i>	499	MLG	[7] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.963	-70.664	X		
<i>P. orbigny</i>	503	MLG	[11] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.963	-70.666	X	X	
<i>P. orbigny</i>	505	MLG	[13] 9/11/05	rio Tarauacá	rio Juruá	-7.963	-70.666	X	X	
<i>Potamotrygon scobina</i>	149	INPA	[10] 9/9/04	Aripuanã		-6.132	-60.225	X	X	X
<i>P. scobina</i>	315	MPA	[1_p383]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X	X	X
<i>P. scobina</i>	317	MPA	[3_p480]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X	X	
<i>P. scobina</i>	318	MPA	[4_p485]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X	X	
<i>P. scobina</i>	319	MPA	[5_p487]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X		
<i>P. scobina</i>	321	MPA	[7_p507]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X		
<i>P. scobina</i>	322	MPA	[8_p510]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X		
<i>P. scobina</i>	323	MPA	[9_p542]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X		
<i>P. scobina</i>	325	MPA	[11_p596]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X		X
<i>P. scobina</i>	326	MPA	[12_p598]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X	X	
<i>P. scobina</i>	329	MPA	[15_p703]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X	X	
<i>P. scobina</i>	331	MPA	[17_p730]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X	X	
<i>P. scobina</i>	332	MPA	[18_p803]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X	X	
<i>P. scobina</i>	333	MPA	19_p801]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X	X	
<i>P. scobina</i>	335	MPA	[21_p811]	ilha de Marajó	rio Solimões	-0.911	-48.289	X	X	
<i>Potamotrygon sp. aff. scobina 1</i>	101	MLG	[2] 23/2/04	rio Demini	rio Negro	-0.799	-62.940	X		X
<i>Potamotrygon sp. aff. scobina 2</i>	371	Winnipeg	[560] 16/1/04	rio Caura	Venezuela	7.013	-64.931	X	X	
<i>P. sp. aff. scobina 2</i>	372	Winnipeg	[572] 17/1/04	rio Caura	Venezuela	7.013	-64.931	X	X	
<i>P. sp. aff. scobina 2</i>	373	Winnipeg	[573] 17/1/04	rio Caura	Venezuela	7.013	-64.931	X	X	
<i>P. sp. aff. scobina 2</i>	375	Winnipeg	[1367] 9/1/05	rio Mavaca	Venezuela	2.450	-65.150	X	X	
<i>Potamotrygon schroederi</i>	40	MLG	[1] 04/03/03	rio Itu	rio Negro	-0.503	-63.245	X		
<i>P. schroederi</i>	53	MLG	[5] 13/01/04	Pente	rio Negro	-0.494	-63.258	X		
<i>P. schroederi</i>	106	MLG	[8] 24/2/04	Rio Demini	rio Negro	-0.797	-62.911			X
<i>P. schroederi</i>	177	MLG	[5] 28/10/04	Rio Demini	rio Negro	-0.701	-62.908	X		X
<i>P. schroederi</i>	188	MLG	[4] 30/10/04	Rio Demini	rio Negro	-0.782	-62.944	X		X
<i>P. schroederi</i>	338	MLG	[18] 20/11/04	rio Aiuanã	rio Negro	-0.538	-64.921	X		
<i>Potamotrygon sp. aff. schroederi</i>	155	Winnipeg	[555] 15/01/04	rio Caura	Venezuela	7.013	64.931			
<i>Potamotrygon sp. aff. schroederi</i>	378	Winnipeg	[1607]16/1/04	Casiquire	Venezuela	2.983	-65.067	X		
<i>Potamotrygon sp. aff. schroederi</i>	374	Winnipeg	[1248] 9/1/05	rio Mavaca	Venezuela	2.45	-65.15	x		
<i>Potamotrygon sp. aff. schroederi</i>	381	Winnipeg	[16]1016/1/04	Casiquire	Venezuela	2.983	-65.067	X	X	
<i>Potamotrygon sp.1</i>	29	MLG	[7] 05/02/03	rio Ararirrá	rio Negro	-0.458	-63.618	X		X
<i>P. sp.1</i>	36	MLG	[6] 06/02/03	rio Cuinuní igarapé do Zamula	rio Negro	-0.754	-63.104	X		
<i>P. sp.1</i>	41	MLG	[1] 11/01/04	Pente	rio Negro	-0.859	-62.769	X		
<i>P. sp.1</i>	57	MLG	[9] 13/01/04	Pente	rio Negro	-0.494	-63.258	X		X
<i>P. sp.1</i>	58	MLG	[10] 13/01/04	Pente	rio Negro	-0.494	-63.258	X		
<i>P. sp.1</i>	63	MLG	[4] 14/1/04	rio Cazurucú	rio Negro	-0.430	-63.368	X		X
<i>P. sp.1</i>	73	MLG	[13] 14/01/04	rio Cazurucú	rio Negro	-0.430	-63.368	X		
<i>P. sp.1</i>	86	MLG	[10] 03/02/04	Daraqá	rio Negro	-0.486	-63.257	X		
<i>P. sp.1</i>	91	MLG	[1] 04/02/04	Daraqá	rio Negro	-0.486	-63.257	X		
<i>P. sp.1</i>	336	-	[15] 9/11/04	rio Aiuanã	rio Negro	-0.538	-64.921	X		X
<i>P. sp.1</i>	361	-	[46] 9/02/05	rio Aiuanã-	rio Negro	-0.871	-65.251			X
<i>Potamotrygon sp.2</i>	167	MLG	[1] 17/10/04	-	rio tapajós	-4.558	-56.252			X
<i>Potamotrygon sp.2</i>	168	MLG	[2] 17/10/04	-	rioTapajós	-4.558	-56.252	X		X
<i>Potamotrygon sp.2</i>	169	MLG	[1] 18/10/04	-	rioTapajós	-4.558	-56.252			X
<i>Potamotrygon sp.2</i>	170	MLG	[3] 18/10/04	-	rioTapajós	-4.558	-56.252	X		X
<i>P. sp.2</i>	482	MLG	[1] 10/10/05	-	rio Tapajós	-	-	X		
<i>P. sp.2</i>	484	MLG	[2] 10/10/05	-	rio Tapajós	-	-	X		
<i>P. sp.2</i>	485	MLG	[3] 10/10/05	-	rio Tapajós	-	-	X		
<i>P. sp.2</i>	488	MLG	[1] 11/10/05	-	rio Tapajós	-	-	X		
<i>P. sp.2</i>	491	MLG	[3] 11/10/05	-	rio Tapajós	-	-	X		
<i>Potamotrygon sp. (sem foto)</i>	145	INPA	[6]	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.019	-60.209	X	X	X
<i>Potamotrygon sp. (sem foto)</i>	146	INPA	[7]	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.019	-60.209	X	X	
<i>Potamotrygon sp. (sem foto)</i>	147	INPA	[8] 9/9/04	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.132	-60.225	X	X	

<i>Potamotrygon</i> sp. (sem foto)	151	INPA	[12] 10/9/04	rio Aripuanã	rio Madeira	-6.010	-60.200	X	X
------------------------------------	-----	------	--------------	--------------	-------------	--------	---------	---	---

ANEXO II

HAPLÓTIPOS DO GENE ATPase SUBUNIDADES 6 E 8 (780PB)UTILIZADOS PARA A ANÁLISE NCA E GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Haplótipo	Espécime	Populações
1	<i>P. motoro</i> 494	1.Tarauaca
1	<i>P. motoro</i> 495	1.Tarauaca
1	<i>Potamotrygon orbignyi</i> 496	1.Tarauaca
1	<i>P. orbignyi</i> 497	1.Tarauaca
1	<i>P. motoro</i> 500	1.Tarauaca
1	<i>P. motoro</i> 501	1.Tarauaca
1	<i>P. motoro</i> 502	1.Tarauaca
1	<i>P. motoro</i> 504	1.Tarauaca
1	<i>P.motoro</i> 506	1.Tarauaca
1	<i>P.motoro</i> 201	2.Jurua
1	<i>P.motoro</i> 202	2.Jurua
1	<i>P.motoro</i> 205	2.Jurua
1	<i>P.motoro</i> 206	2.Jurua
1	<i>P.motoro</i> 207	2.Jurua
1	<i>P.motoro</i> 507	3.Alto Solimões
1	<i>P.motoro</i> 292	4.Mamiraua
1	<i>P.motoro</i> 295	4.Mamiraua
1	<i>P.motoro</i> 298	4.Mamiraua
1	<i>P. motoro</i> 509	5.Solimões
1	<i>P.motoro</i> 511	5.Solimões
1	<i>P. motoro</i> 512	5.Solimões
1	<i>P. motoro</i> 513	5.Solimões
1	<i>P. motoro</i> 514	5.Solimões
1	<i>P.motoro</i> 385	6.Purus
1	<i>P. motoro</i> 390	6.Purus
1	<i>P. motoro</i> 391	6.Purus
1	<i>P.motoro</i> 392	6.Purus
1	<i>P. motoro</i> 414	6.Purus
1	<i>P. motoro</i> 416	6.Purus
1	<i>P. motoro</i> 417	6.Purus
1	<i>P. motoro</i> 418	6.Purus
1	<i>P. motoro</i> 419	6.Purus
1	<i>Potamotrygon motoro</i> 117	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 119	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 121	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 122	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 123	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 124	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 125	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 136	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 157	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 308	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 309	7.Solimões2
1	<i>P.motoro</i> 311	7.Solimões2
1	<i>P. motoro</i> 517	7.Solimões2
1	<i>P. motoro</i> 518	7.Solimões2

Haplótipo	Espécime	Populações
1	<i>P. motoro</i> 519	7.Solimões2
1	<i>P. motoro</i> 539	17.Solimões4
1	mot542	17.Solimões4
2	<i>P. motoro</i> 204	2.Jurua
2	<i>P. motoro</i> 16	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 17	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 24	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 25	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 28	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 31	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 48	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 50	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 79	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 80	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 82	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 97	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 99	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 102	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 105	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 107	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 129	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 132	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 134	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 182	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 184	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 185	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 242	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 250	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 251	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 256	8.Médio Negro
2	<i>P. motoro</i> 264	8.Médio Negro
3	<i>P. motoro</i> 293	4.Mamiraua
4	<i>P. motoro</i> 299	4.Mamiraua
5	<i>P. orbignyi</i> 503	1.Tarauaca
6	<i>P. motoro</i> 383	6.Purus
6	<i>P. motoro</i> 393	6.Purus
6	<i>P. motoro</i> 413	6.Purus
6	<i>P. motoro</i> 415	6.Purus
7	<i>P. motoro</i> 313	7.Solimões2
8	<i>P. motoro</i> 163	14.Maues
9	<i>P. orbignyi</i> 498	1.Tarauaca
10	<i>P. motoro</i> 156	7.Solimões2
10	<i>P. sp.</i> 147	13.Aripuana
10	<i>Potamotrygon scobina</i> 329	19.Marajo
10	<i>P. scobina</i> 333	19.Marajo
11	<i>P. scobina</i> 317	19.Marajo
11	<i>P. scobina</i> 318	19.Marajo
11	<i>P. scobina</i> 326	19.Marajo
11	<i>P. scobina</i> 331	19.Marajo
11	<i>P. scobina</i> 332	19.Marajo
11	<i>P. scobina</i> 335	19.Marajo
12	<i>Potamotrygon orbignyi</i> 493	1.Tarauaca
13	<i>P. orbignyi</i> 126	7.Solimões2

Haplótipo	Espécime	Populações
14	<i>P. orbignyi</i> 505	1.Tarauaca
15	<i>P. motoro</i> 480	16.Tapajos
16	<i>P. scobina</i> 149	13.Aripuana
17	<i>P. orbignyi</i> 144	13.Aripuana
17	<i>P. sp.</i> 146 (provável orbignyi)	13.Aripuana
17	<i>P. orbignyi</i> 148	13.Aripuana
17	<i>P. orbignyi</i> 152	13.Aripuana
18	<i>P. sp.</i> 145	13.Aripuana
19	<i>P. motoro</i> 6	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 14	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 30	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 35	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 49	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 52	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 74	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 78	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 130	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 131	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 135	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 190	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 214	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 234	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 248	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 249	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 254	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 255	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 258	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 259	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 261	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 263	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 266	8.Médio Negro
19	<i>P. motoro</i> 343	9.Alto Negro
19	ven375Mav	10.Mavaca
20	<i>P. motoro</i> 34	8.Médio Negro
21	<i>P. motoro</i> 154	11.Parguaza
22	<i>P. motoro</i> 467	16.Tapajos
23	<i>P. motoro</i> 463Tap	16.Tapajos
23	<i>P. motoro</i> 468	16.Tapajos
23	<i>P. motoro</i> 469	16.Tapajos
23	<i>P. orbjabmot</i> 470	16.Tapajos
23	<i>P. motoro</i> 473	16.Tapajos
23	<i>P. motoro</i> 474	16.Tapajos
23	<i>P. motoro</i> 476	16.Tapajos
24	<i>P. motoro</i> 464	16.Tapajos
24	<i>P. motoro</i> 472	16.Tapajos
24	<i>P. motoro</i> 475	16.Tapajos
25	<i>P. orbignyi</i> 19	8.Médio Negro
25	<i>P. orbignyi</i> 20	8.Médio Negro
25	<i>P. orbignyi</i> 55	8.Médio Negro
25	<i>P. orbignyi</i> 344	9.Alto Negro
25	<i>P. orbignyi</i> 346	9.Alto Negro
25	<i>P. orbignyi</i> 347	9.Alto Negro
25	<i>P. orbignyi</i> 353	9.Alto Negro

Haplótipo	Espécime	Populações
25	<i>P. orbigny</i> 354	9.Alto Negro
25	<i>P. orbigny</i> 357	9.Alto Negro
26	<i>P. orbigny</i> 3	8.Médio Negro
27	<i>P. orbigny</i> 355	9.Alto Negro
27	<i>P. orbigny</i> 358	9.Alto Negro
28	<i>P. orbigny</i> 342	9.Alto Negro
29	<i>P. aff. scobina</i> 2 371	12.Caura
29	<i>P. aff. scobina</i> 2 373	12.Caura
29	<i>P. motoro</i> 547	18.Solimoes5
30	<i>P. motoro</i> 552	18.Solimoes5
30	<i>P. motoro</i> 554	18.Solimoes5
31	<i>P. motoro</i> 478	16.Tapajos
31	<i>P. motoro</i> 549	18.Solimoes5
32	<i>P. motoro</i> 551	18.Solimoes5
33	<i>P. scobina</i> 315	19.Marajo
34	<i>P. motoro</i> 522	15.Solimoes3
34	<i>P. motoro</i> 524	15.Solimoes3
34	<i>P. motoro</i> 529	15.Solimoes3
34	<i>P. motoro</i> 531	17.Solimões4
34	<i>P. motoro</i> 537	17.Solimões4
34	<i>P. motoro</i> 543	17.Solimões4
34	<i>P. motoro</i> 548	18.Solimoes5
34	<i>P. motoro</i> 550	18.Solimoes5
35	<i>P. motoro</i> 384	6.Purus
35	<i>P. motoro</i> 394	6.Purus
36	<i>P. motoro</i> 395	6.Purus
37	<i>P. motoro</i> 420	6.Purus
38	<i>P. motoro</i> 546	18.Solimoes5
39	<i>P. motoro</i> 118	7.Solimões2
39	<i>P. motoro</i> 120	7.Solimões2
39	<i>P. motoro</i> 160	7.Solimões2
39	143Ari	13.Aripuana
39	151Ari	13.Aripuana
39	<i>P. motoro</i> 540	17.Solimes4
39	<i>P. motoro</i> 544	17.Solimes4
40	<i>P. motoro</i> 140	13.Aripuana
40	<i>P. motoro</i> 141	13.Aripuana
41	<i>P. motoro</i> 142	13.Aripuana
42	<i>P. sp. aff. scobina</i> 2 372	12.Caura
43	<i>P. motoro</i> 161	7.Solimões2
44	<i>P. orbigny</i> 466	16.Tapajos
44	<i>P. motoro</i> 477	16.Tapajos
45	<i>P. orbigny</i> 471	16.Tapajos

ANEXO III

Espécimes da família Potamotrygonidae analisados nesse estudo.



Foto: R. Bernhard

Paratrygon aiereba
rio Aripuanã



Extraída da internet

Plesiotrygon iwamae
rio Solimões



Foto: T. Hrbek

Potamotrygon leopoldi
rio Xingu

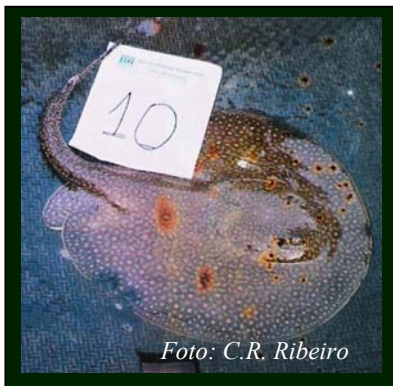


Foto: C.R. Ribeiro

Potamotrygon falkneri
rio Paraná

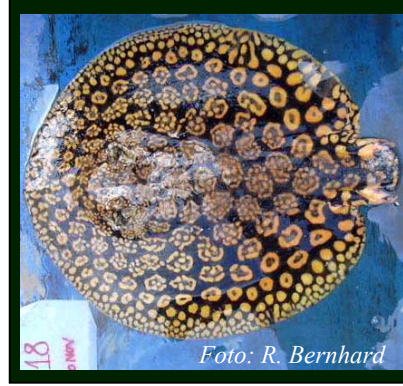


Foto: R. Bernhard

Potamotrygon schroederi
rio Negro



Foto: S.C. Willis

Potamotrygon aff. schroederi
rio Caura



Foto: M.L.G. Araújo

Potamotrygon sp. 1
rio Negro



Extraída da internet

Potamotrygon henlei
rio Tocantins



Foto: M.L.G. Araújo

Potamotrygon sp. 2
rio Tapajós



Foto: M.L.G. Araújo

Potamotrygon motoro
rio Negro



Foto: D. Toffoli

Potamotrygon motoro
rio Purus



Foto: D. Toffoli

Potamotrygon motoro
reserva Mamirauá



Foto:
S.C.Willis

Potamotrygon motoro
rio Parguaza



Foto: R. Bernhard

Potamotrygon motoro
rio Aripuanã



Foto: S. Mello

Potamotrygon motoro
rio Tarauacá



Foto: S. Mello

Potamotrygon motoro
rio Tarauacá

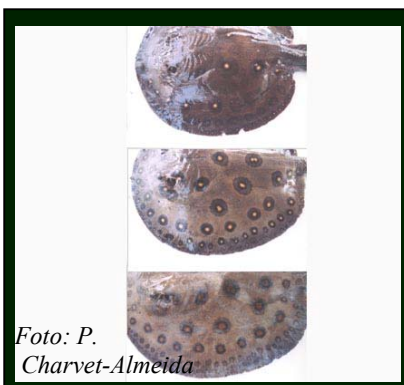


Foto: P.
Charvet-Almeida

Potamotrygon motoro
calha rio Amazonas



Foto: M.L.G. Araújo

Potamotrygon orbignyi
rio Negro



Foto: R. Bernhard

Potamotrygon orbignyi
rio Aripuanã



Foto: S. Mello

Potamotrygon orbignyi
rio Tarauacá



Foto: M.L.G. Araújo

Potamotrygon orbignyi
rio Tapajós



Foto: M.P. Almeida

Potamotrygon scobina
baía do Marajó



Foto: M.P. Almeida

Potamotrygon scobina
baía do Marajó



Foto: M.P. Almeida

Potamotrygon scobina
baía do Marajó



Foto: R. Bernhard

Potamotrygon aff.
scobina 1 rio Aripuanã



Foto: S.C. Willis

Potamotrygon aff.
scobina 2 rio Mavaca



Foto: R. Bernhard

Potamotrygon aff.
scobina 2 rio Caura

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)