



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO
CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE CAXIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE,
AMBIENTE E SAÚDE

CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE CAXIAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO (MESTRADO) EM BIODIVERSIDADE,
AMBIENTE E SAÚDE

Walna Micaelle de Moraes Pires

**DIVERSIDADE GENÉTICA NO COMPLEXO *Hoplias malabaricus* (BLOCH,
1794) (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) EM BACIAS
HIDROGRÁFICAS MARANHENSES**

CAXIAS - MA
2016

WALNA MICAELLE DE MORAES PIRES

DIVERSIDADE GENÉTICA NO COMPLEXO *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) EM BACIAS HIDROGRÁFICAS MARANHENSES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga- CESC/UEMA

Caxias - MA
2016

P667d Pires, Walna Micaelle de Moraes

Diversidade genética no complexo *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes, Erythrinidae) em bacias hidrográficas maranhenses / Walna Micaelle de Moraes Pires __Caxias-MA: CESC/UEMA, 2016.

68f.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Superiores de Caxias, Curso Mestrado em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

1. Traíra. 2. Espécies - Complexo. 3. Divergência genética. 4. Maranhão.
I. Pires, Walna Micaelle de Moraes. II. Título.

CDU 597(812.1)

WALNA MICAELLE DE MORAES PIRES

**DIVERSIDADE GENÉTICA NO COMPLEXO *Hoplias malabaricus* (BLOCH,
1794) (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) EM BACIAS
HIDROGRÁFICAS MARANHENSES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Elmary da Costa Fraga (Orientador)
Doutor em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual do Maranhão

Prof^o Dr. Luís Fernando Carvalho Costa (Membro)
Doutor em Ciências (Ecologia e Recursos Naturais)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Maria Claudene Barros (Membro)
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão

Dedico a minha família pelo apoio incondicional recebido durante o decorrer desses dois anos, em especial aos meus pais (Walter Pires e Nazaré Lopes) meus mecenas.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

(Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por ter me permitido chegar ao fim dessa jornada.

Ao professor Dr. Elmary Fraga pela confiança na realização deste trabalho, pelos ensinamentos e pelas críticas que sempre me ensinaram muito.

A Professora Dr^a. Maria Claudene Barros, pela ajuda nos momentos em que necessitei e pelos puxões de orelha seguido do famoso “te vira” e pelos ensinamentos transmitidos durante o curso. Coordenadora melhor não poderia existir!

A CAPES e a FAPEMA pela bolsa concedida.

A Universidade Estadual do Maranhão pela formação acadêmica.

A todos os professores do curso, que demonstraram comprometimento com a nossa turma, a pioneira, e fizeram com que o sonho do mestrado fosse algo possível. Que eles possam continuar motivando os alunos a prosseguirem.

Aos professores Hermeson Cassiano, Bruno Campos e Iracilda Sampaio, pela correção do projeto e sugestões feitas com o intuito de melhorar o trabalho. Especialmente a professora Iracilda que nos cedeu amostras de tecidos as quais foram incorporadas ao nosso banco de dados e ao Bruno pela ajuda com alguns softwares laboratoriais que eu não tinha domínio. Muito obrigada!!

Ao Dr. Claudio Oliveira por me receber muito bem durante o estágio junto com sua equipe de trabalho e a todos do laboratório de Biologia de Peixes da UNESP-Botucatu, em especial Maria Lígia Oliveira, Érica Serrano e Silvana Melo (Sil) que me ajudaram durante o estágio e me fizeram vê o quanto a Citogenética é bonita.

À minha família pelo apoio e compreensão em especial aos meus pais Walter Pires (exemplo de ser humano) e Nazaré Lopes que sempre me incentivaram e me apoiaram, abrindo mão de minha presença em muitas ocasiões por entenderem que era por um propósito maior. As minhas irmãs (Walnara e Walneane) pela amizade, companheirismo e carinho. Orgulho-me de vocês e de fazer parte dessa família!

A todos os meus colegas de turma, pessoas especiais em minha vida que jamais esquecerei e para quem desejo todo o sucesso do mundo em especial as amigas Gizélia Cunha e Caroline Kelly (Equipe Bala) com as quais dividi as alegrias e correrias da vida de mestranda e por quem tenho um carinho muito especial. Ao amigo Marcelo Ventura por ser a pessoa mais inteligente e mais humilde que eu conheço, sempre disposto a ajudar e repassar seus inúmeros conhecimentos (O Renascentista da turma), meus sinceros agradecimentos.

As minhas amigas-irmãs: Aylane Tamara, Esmeralda Conceição e Marcia Mascarenhas pelo prazer de suas companhias e sua sincera amizade, por estarem

presentes sempre que precisei, muitas vezes enxugando minhas lágrimas e me acalmando quando os experimentos não davam certo, mostrando como é bom ter AMIGOS.

À segunda família meus amigos do GENBIMOL eternos companheiros, pessoas com as quais convivi muitas vezes mais do que com minha própria família. Em especial Maria Histelle, a melhor pessoa para se chamar de Amiga, sempre calma e brincalhona, com suas belas melodias e vontade de ser Princesa da Disney; fazendo-nos rir e descontraindo o ambiente. Ao Marcelo Almeida, pessoa muito querida por todos e com muita boa vontade para ajudar a quem precisa (exceto quando fica zangado rsrs). Ao meu amigo mais chato de todos, Daniel Limeira, obrigada pelos conselhos, pela ajuda quando precisei, pelo mapa (motivo de muita humilhação), enfim por todo o carinho recebido! Ao Paulo Bryguel (Bibi) pessoa mais top do laboratório, reitor da UEMA, pelos momentos de descontração e por sua presença sempre alegre (Migo seu loko)! Ao amigo Bruno Rafael, por toda a ajuda recebida, pelos momentos de brincadeiras e principalmente pelos bolos e tortas de segunda- feira (realmente deliciosos). A Sulamita, a pessoa mais elétrica e agoniada do laboratório. A amiga Andrelina, pessoa mais carinhosa que conheço e atenciosa também, por sua presença sempre reconfortante, obrigada. A amiga Ana Priscila, pelos momentos de descontração no laboratório e de conversas sempre produtivas. A Adriana pela ajuda em algumas extrações, visualizações em gel de agarose, etc. Obrigada! Ao amigo Aryel, pelas conversas sempre inteligentes e indicações das melhores séries. Afinal, distrair também é preciso. As irmãs Luciana e Luana Luz (futuras doutoras), companheiras de viagem a Bragança. Viagem esta muito produtiva e enriquecedora, obrigada pelas risadas e pelo convite de cursar a disciplina com vocês. Bragança foi simplesmente perfeita e vocês tornaram o momento inesquecível (e continua desenrolando rsrs). Obrigada!

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho minha eterna gratidão. Muito obrigada!

RESUMO

A espécie *Hoplias malabaricus*, conhecida popularmente como traíra é considerada uma única espécie nominal, porém, estudos citogenéticos e moleculares vêm confirmando a existência de um complexo de espécies com uma diversidade cariotípica de sete citótipos reconhecidos. Neste contexto, objetivando determinar os padrões de diversidade genética, bem como a ocorrência de diferentes linhagens em bacias hidrográficas maranhenses utilizou-se os genes mitocondriais COI, rRNA 16S, Citocromo *b* e o gene nuclear α - tropomiosina. Amostras de *H. malabaricus* foram coletadas dos rios Turiçu, Pindaré, Mearim, Itapecuru e Parnaíba. O DNA total foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega seguindo as instruções do fabricante e a amplificação gênica realizada via PCR com posterior sequenciamento. Os dados foram analisados com os softwares BioEdit, MEGA6, DNAsp 5.1, Haploviewer, Modelgenerator 0.85, MrBayes 3.2, Mesquite 2.75 e ARLEQUIN 3.5. Os resultados revelaram um processo de diferenciação genética entre as amostras analisadas, com valores de divergência genética elevados chegando a 4% para o gene TROP. As árvores geradas mostraram topologias similares com a formação de pelo menos cinco clados maranhenses distintos e bem suportados para todos os marcadores, confirmando a ocorrência de mais de uma linhagem desta espécie nas bacias estudadas, como observado nas populações dos rios Itapecuru e Mearim (duas linhagens). A AMOVA mostrou valores de F_{st} de moderados a alto (0,640 – COI; 0,595 – Cyt *b*; 0,611 – rRNA 16S e 0,251 - TROP) e valores de p altamente significativos, confirmando processo de diferenciação em curso. Nossos resultados evidenciam um processo de diferenciação genética em *H. malabaricus* nas bacias estudadas, uma vez que, obtivemos pelo menos cinco linhagens diferentes corroborando com os dados cromossômicos e citogenéticos existentes na literatura e reforçando a necessidade de uma revisão taxonômica.

Palavras-chave: Traíra, Complexo de espécies, Divergência Genética, Maranhão.

ABSTRACT

The species *Hoplias malabaricus*, popular trahira is considered a single nominal species, however, cytogenetic and molecular studies have confirmed the existence of a complex of species with a karyotype diversity of seven recognized cytotypes. In this context, aiming determine the genetic diversity patterns and the lineage occurring in Maranhão basins we used the mitochondrial genes COI, 16S rRNA, cytochrome b and the nuclear gene α -tropomyosin. *H. malabaricus* samples were collected from rivers Turiaçu, Pindaré, Mearim, Itapecuru and Parnaíba. Total DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit of Promega according to the manufacturer's instructions and the gene amplification performed by PCR with subsequent sequencing. The data were analyzed with the software BioEdit, MEGA6, DNAsp 5.1, Haploviewer, Modelgenerator 0.85, MrBayes 3.2, Mesquite 2.75 and ARLEQUIN 3.5. The results revealed a process of genetic differentiation among the analyzed samples, with high values of genetic divergence reaching 4% for the TROP gene. The trees generated showed similar topologies with the formation of at least five distinct and well supported Maranhão clades for all the markers, confirming the occurrence of more than one lineage of this species in the studied basins, as observed in the populations of the Itapecuru and Mearim rivers (two strains). The AMOVA showed moderate to high F_{st} values (0.640 - COI, 0.595 - Cyt b, 0.611 - 16S rRNA and 0.251 - TROP) and highly significant p values, confirming the ongoing differentiation process. Our results show a process of genetic differentiation in *H. malabaricus* in the studied basins, since we obtained at least five different strains corroborating with the existing chromosomal and cytogenetic data in the literature and reinforcing the need for a taxonomic revision.

Keywords: Trahira, species complex, Genetic Divergence, Maranhão.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Localização das áreas de estudo, modificado por LIMEIRA FILHO, 2015. Criado com o programa Quantum GIS 2.6. 20
- Figura 2** - Rede de haplótipos gerada para populações de *H. malabaricus* provenientes das bacias maranhenses e amazônica com base no gene COI. 28
- Figura 3** - Árvore de haplótipos para o gene COI obtida através do modelo GTR+I+G, rodadas 4 000 000 gerações. O suporte dos ramos foi estimado através do teste aproximado de verossimilhança “Shimodaira-Hasegawa-like interpretation”. 29
- Figura 4.** - Rede de haplótipos gerada para populações de *H. malabaricus* provenientes das bacias maranhenses e amazônica com base no gene *Cyt b*. 33
- Figura 5** - Árvore de haplótipos para o gene *Cyt b* obtida através do modelo GTR+I+G, rodadas 5 000 000 gerações. O suporte dos ramos foi estimado através do teste aproximado de verossimilhança “Shimodaira-Hasegawa-like interpretation”. 35
- Figura 6** - Rede de haplótipos gerada para populações de *H. malabaricus* provenientes das bacias maranhenses e amazônica com base no gene rRNA 16S. 38
- Figura 7** - Árvore de haplótipos para o gene rRNA 16S obtida através do modelo HKY+I+G, rodadas 4 000 000 gerações. O suporte dos ramos foi estimado através do teste aproximado de verossimilhança “Shimodaira-Hasegawa-like interpretation”. 40
- Figura 8** - Rede de haplótipos gerada para populações de *H. malabaricus* provenientes das bacias maranhenses e amazônica com base no gene TROP. 43
- Figura 9** - Árvore de haplótipos para o gene TROP obtida através do modelo HKY+I+G, rodadas 5.000.000 gerações. O suporte dos ramos foi estimado através do teste aproximado de verossimilhança “Shimodaira-Hasegawa-like interpretation”. 44
- Figura 10** - Árvore concatenada dos genes COI, rRNA16S e *Cyt b* através do modelo KHY+G, rodadas 5.000.000 gerações. O suporte dos ramos foi estimado através do teste aproximado de verossimilhança “Shimodaira-Hasegawa-like interpretation”. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das espécies da família Erythrinidae, segundo os gêneros.	21
Tabela 2 - Condições de PCR para isolamento dos genes: COI, rRNA 16S, Cyt <i>b</i> e TROP.	22
Tabela 3 - Diversidade genética dos espécimes de <i>H. malabaricus</i> baseado em 630 pb do gene COI.	26
Tabela 4 -. Percentual médio de divergência nucleotídica gerada através do programa Mega 6 para o gene COI nas populações de <i>H. malabaricus</i> .	30
Tabela 5 - Resultados da AMOVA nas populações de <i>H. malabaricus</i> analisadas.	30
Tabela 6 - Identificação molecular dos haplótipos mais frequentes de <i>H. malabaricus</i> realizada através de comparações de sequências obtidas com sequências disponíveis na plataforma BOLDSystems.	31
Tabela 7 - Diversidade genética dos espécimes de <i>H. malabaricus</i> baseado em 800 pb do gene Cyt <i>b</i> .	32
Tabela 8 - Percentual médio de divergência nucleotídica gerada através do programa Mega 6 para o gene Cyt <i>b</i> nas populações de <i>H. malabaricus</i> .	36
Tabela 9 - Resultados da AMOVA nas populações de <i>H. malabaricus</i> analisadas.	36
Tabela 10 - Diversidade genética dos espécimes de <i>H. malabaricus</i> baseado em 564 pb do gene rRNA 16S.	37
Tabela 11 - Percentual médio de divergência nucleotídica gerada através do programa Mega 6 para o gene rRNA 16S nas populações de <i>H. malabaricus</i> .	39
Tabela 12 - Resultados da AMOVA nas populações de <i>H. malabaricus</i> analisadas.	41
Tabela 13 - Diversidade genética dos espécimes de <i>H. malabaricus</i> baseado em 490 pb do gene TROP.	41
Tabela 14 - Percentual médio de divergência nucleotídica gerada através do programa Mega 6 para o gene TROP nas populações de <i>H. malabaricus</i> .	42
Tabela 15 - Resultados da AMOVA nas populações de <i>H. malabaricus</i> analisadas para o gene TROP.	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Geral	18
2.2. Específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Área de Coleta	19
3.2. Amostragem	20
3.3. Extração de DNA	21
3.4. Amplificação via Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	21
3.5. Purificação das amostras purificadas	23
3.6. Reação de sequenciamento	23
3.7. Precipitação em EDTA/Etanol	23
3.8. Sequenciamento	23
3.9. Análise dos dados	24
4. RESULTADOS	26
4.1. Gene COI	26
4.1.1. Análise do Polimorfismo do fragmento e Diversidade Genética	26
4.1.2. Análises Filogenéticas e Distância Genética	27
4.1.3. Análise Molecular de Variância (AMOVA)	30
4.1.4. Análise no BOLDSystem	31
4.2. Gene <i>Cyt b</i>	32
4.2.1. Análise do Polimorfismo do fragmento e Diversidade Genética	32
4.2.2. Análises Filogenéticas e Distância Genética	34
4.2.3. Análise Molecular de Variância (AMOVA)	36
4.3. Gene rRNA 16S	37
4.3.1. Análise do Polimorfismo do fragmento e Diversidade Genética	38
4.3.2. Análises Filogenéticas e Distância Genética	39
4.3.3. Análise Molecular de Variância (AMOVA)	40
4.4. Gene TROP	41
4.4.1. Análise do Polimorfismo do fragmento e Diversidade Genética	41
4.4.2. Análises Filogenéticas e Distância Genética	42
4.4.3. Análise Molecular de Variância (AMOVA)	44
4.5. Análise dos dados concatenados	45

5. DISCUSSÃO	47
5.1. Identificação Molecular	47
5.2. Diversidade Genética	48
5.3. Relações filogenéticas	50
5.4. Estruturação Populacional	53
6. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO	65

1. INTRODUÇÃO

A família Erythrinidae compreende um pequeno grupo de Characiformes com apenas 15 espécies, agrupadas nos gêneros *Erythrinus* Scopoli, 1777, *Hoplerythrinus* Gill, 1985 e *Hoplias* Gill, 1903, distribuídas na região Neotropical (BIFI, 2013). Trata-se de um táxon endêmico das Américas do Sul e Central, e seus representantes são caracterizados, principalmente, por apresentar corpo cilíndrico, nadadeira adiposa ausente, dentes cônicos e caninos de vários tamanhos, firmemente implantados nas maxilas e nadadeira caudal arredondada (OYAKAWA, 2003).

As espécies de Erythrinidae são conhecidas como traíra, lobó, trairão, trairuçú, jeju e morobá. Apesar de ser uma família relativamente pequena, a identificação precisa das espécies que a compõe é bastante problemática. O gênero *Hoplias*, por exemplo, é taxonomicamente confuso, e também o gênero mais diverso, com dez espécies reconhecidas e dispostas em dois grupos: o grupo *Hoplias lacerdae* contendo nove espécies e o grupo monotípico *H. malabaricus* que tem apenas uma única espécie (OYAKAWA; MATTOX, 2009).

Para Morellí et al.(2007), *H. malabaricus* apresenta o corpo cilíndrico com uma leve depressão lateral, possui nadadeira dorsal angular, cabeça bastante longa, boca ampla e mandíbulas proeminentes, possui dentes fortes e cônicos, com presença de caninos. Os olhos são circulares e estão dispostos na metade proximal da cabeça. A porção dorsal da cabeça mostra-se mais escura do que a ventral, assim como o restante do corpo, que varia desde marrom escuro passando a um bege claro. O padrão de coloração possibilita que a traíra se camufle na vegetação para capturar suas presas (OYAKAWA, 1998). É uma espécie sedentária bem adaptada a ambientes lênticos de água doce, com baixa profundidade e com vegetação, onde se refugia e constrói seus ninhos, embora possa ser encontrada em rios de grande e pequeno porte (SABINO; ZUANON, 1998).

As traíras são peixes carnívoros predadores de insetos aquáticos, camarões e pequenos peixes, que capturam com a estratégia de emboscada. As formas jovens são onívoras, alimentando-se de algas, larvas de insetos e peixes (OYAKAWA, 2003; SANTOS et al,2004; SANTOS et al., 2006). Um dos principais aspectos que refletem a capacidade de adaptação de uma espécie aos fatores ambientais é o processo reprodutivo, considerando-se as características anatômicas, fisiológicas comportamentais de uma dada espécie (MARQUES et al, 2001). Nesse sentido, com

cerca de um ano, os espécimes de *H. malabaricus* alcançam aproximadamente 15 cm de comprimento total e já apresentam maturidade sexual. O período de desova é longo, sendo esta de forma parcelada, abrangendo cerca de cinco meses, mas o pico da desova ocorre geralmente no começo do período de cheia dos rios (MARQUES et al, 2001). Além de sua importância ecológica, apresenta extrema importância na pesca artesanal e comercial (BARROS et al. 2007), uma vez que a abundância desta espécie em áreas, faz com que seja utilizada para alimentação das comunidades pesqueiras.

Estudos citogenéticos em *Hoplias* vêm sendo realizados desde a década de 70 (BERTOLLO et al., 1978; BERTOLLO et al., 2000; PAZZA; JÚLIO Jr., 2003; VICARI et al., 2005; JACOBINA et al., 2009; BLANCO et al., 2010; MARQUES et al., 2013). Além desses, estudos mais recentes de cunho molecular (SANTOS et al., 2009; PEREIRA et al., 2012, MARQUES et al., 2013) vêm confirmando a existência de um complexo de espécies atribuídas a esta espécie. Uma vez que estes estudos revelaram uma diversidade cariotípica com sete citótipos reconhecidos denominados de A-G com uma elevada diversidade genética. Para a região de São Luís no Maranhão, foi reportado por Bertollo et al. (2000) que as populações de *H. malabaricus* são caracterizadas pelo citótipo F ($2n=40$), com distribuição geográfica do Suriname ao rio São Francisco. Uma forte evidência para a existência de um complexo de espécies crípticas é a falta de registros de híbridos em áreas onde estes citótipos ocorrem em simpatria (BERTOLLO et al., 2000; PAZZA; JÚLIO Jr., 2003).

A delimitação precisa das espécies é um problema clássico das ciências biológicas. Os dados morfológicos foram, historicamente, os primeiros a serem utilizados na identificação de espécies. Com o desenvolvimento de novos métodos, novas metodologias foram se tornando disponíveis para o estudo da biodiversidade, sendo que no fim da década de 70 e início de 80 as investigações com DNA mitocondrial passaram a ser um dos principais métodos para diferenciação de espécies (AVISE, 2004). Mais recentemente, métodos baseados em sequências de DNA ganharam popularidade, devido a esta molécula ser relativamente estável, poder ser acessada em todos os estágios de vida e porque sequências de DNA são rapidamente reproduzidas (WARD et al., 2009; HEBERT et al, 2003; WARD et al, 2005).

As ideias originais sobre o uso de marcadores moleculares para a identificação de espécies biológicas datam da década de 70 do século passado. Hebert et al. (2004) citam que Carl Woese foi o primeiro a aplicar o estudo de diferenças em sequências nucleotídicas em um único gene para investigar as relações evolutivas entre indivíduos

(WOESE; FOX, 1977). Nesse sentido, dados moleculares têm sido cada vez mais empregados em estudos populacionais na identificação de espécies e níveis superiores. As abordagens genéticas são ferramentas valiosas quando o uso de características morfológicas na taxonomia é dificultado por espécies potencialmente crípticas ou de extrema variabilidade fenotípica (LOVEJOY; DE ARAÚJO, 2000).

O uso de marcadores moleculares para a identificação de estoques pesqueiros e sua variabilidade genética tem sido realizado de forma crescente e eficaz (SANTOS et al., 2006). Segundo Benites (2008) a caracterização da ictiofauna, sob o ponto de vista genético fornece subsídios para estimar-se a variabilidade das espécies no ambiente, sendo fundamentais como ferramenta em projetos de manejo e conservação. Portanto, compreender as estruturas populacionais das espécies é um dos maiores objetivos da biologia, especialmente para peixes teleósteos, os quais apresentam grande variabilidade nas estratégias e práticas para sobrevivência (ORSI et al., 2004). De acordo com Galletti (2009) estudos populacionais são indispensáveis na identificação dos diferentes estoques pesqueiros, entretanto estudos de identificação e populacional para *H. malabaricus* nas bacias hidrográficas do Maranhão ainda são incipientes, embora o estado esteja localizado em uma região de transição entre a Amazônia, o Cerrado e a Caatinga, possuindo importantes rios, tais como, Parnaíba, Itapecuru, Mearim, Pindaré e Turiaçu.

Como a espécie *H. malabaricus* é taxonomicamente confusa, com a ocorrência de sete citótipos reconhecidos e com grande variabilidade genética para os mesmos, pretendeu-se verificar se os espécimes maranhenses pertencem a uma única linhagem, por meio da análise dos índices de diversidade genética e assim aumentar o conhecimento sobre as populações de *H. malabaricus*. Portanto, a partir do sequenciamento de regiões do DNA mitocondrial e nuclear contribuir no esclarecimento de questões taxonômicas de *H. malabaricus* dos rios maranhenses, bem como verificar se o possível (eis) citótipo(s) ocorrente(s) possui um padrão de diversidade genética elevada. Os resultados obtidos contribuirão para a definição do *status* deste recurso pesqueiro nas diferentes bacias do Estado, sendo esta informação útil no gerenciamento da manutenção do patrimônio genético da espécie.

2. OBJETIVOS:

2.1. Geral:

- Avaliar a estrutura genética de populações de *H. malabaricus*, em bacias hidrográficas maranhenses utilizando sequências do genoma mitocondrial e nuclear para testar a hipótese de ocorrência de diferentes linhagens para a espécie.

2.2. Específicos:

- Identificar geneticamente (DNA *barcoding*) os estoques de *H. malabaricus* utilizando sequências de DNA mitocondrial do gene COI;
- Verificar o grau de divergência genética nos estoques de *H. malabaricus* por meio dos genes COI, rRNA 16S, Cyt *b* e TROP, bem como a ocorrência de diferentes linhagens;
- Gerar filogenias moleculares baseadas em sequências de DNA mitocondrial e DNA nuclear;
- Testar a ocorrência de diferenciação e estruturação entre as populações analisadas;
- Contribuir com informações para a taxonomia deste complexo de espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de coleta

As amostras foram obtidas dos seguintes rios maranhenses: Itapecuru, Pindaré, Mearim, Turiaçu e Parnaíba que possuem diferentes características hídricas (Figura 1).

A bacia do rio Itapecuru situa-se na parte centro-leste do Estado do Maranhão, entre as coordenadas 2°51' a 6° 56' Latitude S e 43°02' a 43°58' Longitude W, com uma área de 52. 972,1 km² (SUDENE, 1977).

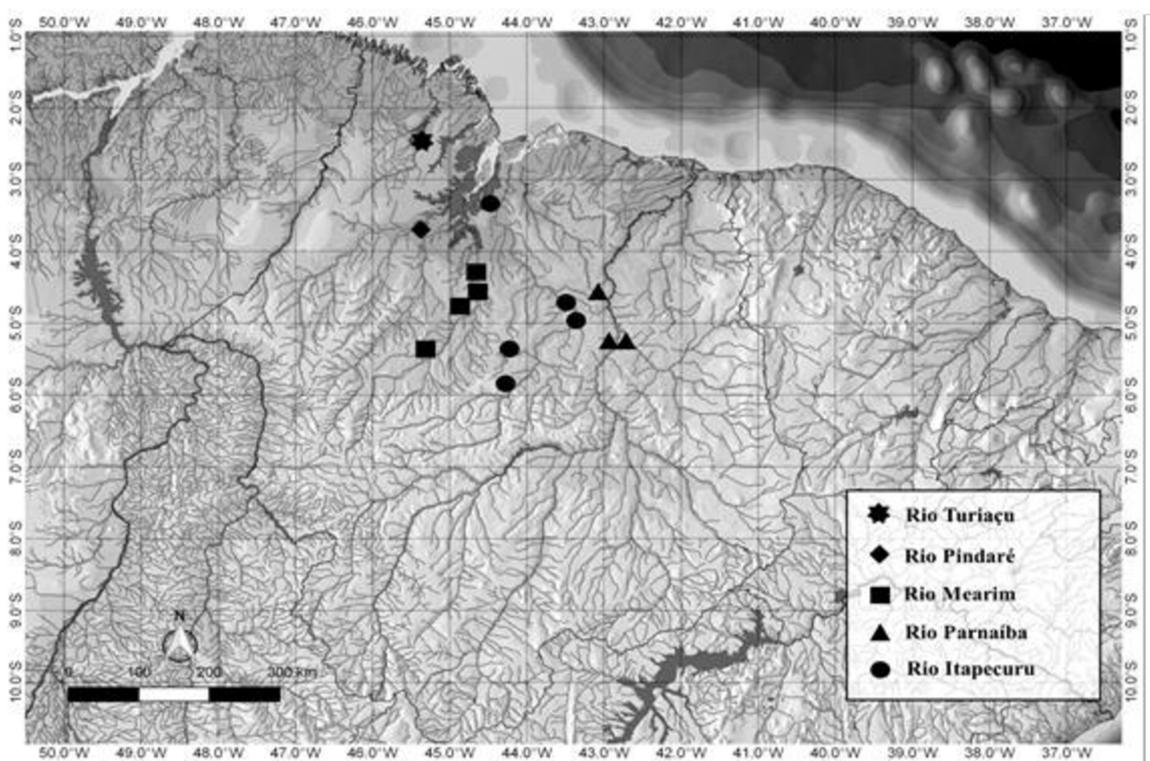
O rio Parnaíba nasce na chapada das Mangabeiras (10°15'S 45°50'W) e desemboca em forma de delta entre as baías do Caju e das Canárias (2°21'S 43°55'W), após um percurso de aproximadamente 1.400 km, atravessando os estados do Maranhão e Piauí (CODEVASF, 2010).

Genuinamente maranhense, o rio Mearim, tem suas nascentes nas encostas setentrionais da Serra da Menina, em altitudes de 400 a 500 m aproximadamente, entre as coordenadas 3°18'S 44°48'W, com curso total de aproximadamente 930 km (IBGE, 2002).

O Rio Pindaré, nasce na Serra do Gurupi (5°49'S 46°53'W) e tem curso de aproximadamente 680 km (BRASIL, 2006). A partir de Alto Alegre do Pindaré, o rio torna-se meandrante formando grandes lagos na região da Baixada Maranhense, tais como Viana e Penalva (PIORSKI, 2010).

A bacia hidrográfica do Rio Turiaçu é considerada secundária (possui um afluente que irá desembocar no rio principal), situa-se na porção ocidental do território maranhense. Sua cabeceira situa-se na Serra da Desordem (3°10'S e 46°30'W) em terrenos com cotas de 200 a 300 metros. Reúne rios de trajetos curtos, mas bastante caudalosos e piscosos, que apresentam características amazônicas e sofrem constante a influência das marés (IBGE, 1997).

Figura 1. Localização dos pontos amostrais em cada bacia. Modificado por TEIXEIRA (2016). Criado com o programa Quantum GIS 2.6.



3.2. Amostragem

A amostragem foi constituída de espécimes de *H. malabaricus* coletados no curso das bacias dos rios Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba e Turiaçu, sendo cerca de 25 espécimes em cada bacia (Tabela 1). Para a coleta foram utilizados apetrechos de pesca como redes de arrasto, malhadeiras de vários milímetros, currais e tarrafas. Para a identificação taxonômica utilizou-se literatura científica (BRITSKI et al., 1999; PIORSKI et al., 2007; BERTOLLO et al., 2000) e posterior confirmação por especialista. O material testemunho (voucher) de cada uma das bacias foi depositado no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina- MZUEL e o restante dos espécimes foram depositados na coleção Zoológica do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão CESC/UEMA. As coletas realizaram-se mediante a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (n°. 02012.004159/2006 -rio Itapecuru, ICMBIO n°.46367-1 -rio Pindaré, ICMBIO- MMA n° 42.119-2 - rio Mearim e ICMBIO n°. 46367-1 - rio Turiaçu).

Tabela 1. Locais de coleta, número de exemplares e respectivas coordenadas geográficas.

Bacias Hidrográficas	Número de exemplares	Coordenadas Geográficas
Itapecuru	50	4°37'14"S/ 43°27'49"W (Aldeias Altas); 06°01'33"S/ 44°14'57"W (Colinas); 02°56'04"S/ 44°14'06"W (Rosário); 5°23'18"S/ 44°04'03"W (Eugênio Barros); 04°51'32"S/ 43° 21'22"W (Caxias)
Parnaíba	23	05°05'39"S/ 42°50'12"W (Timon); 05°05'21"S/ 42°48'07"W (Teresina); 04°15'24"S/ 43°00'46"W (Coelho Neto)
Pindaré	27	3°39'54"S/ 45°25'31"W (Pindaré Mirim)
Mearim	26	3°39'54"S/ 44°47'30"W (Bacabal); 04°34'08"S/ 44°35'31"W (Pedreiras); 05°30'20"S/ 45°14'36"W (Barra do Corda); 4°2'26"S/ 44°28'6"W (São Matheus)
Turiaçu	33	2°13'44"S/45°17'48"W (Santa Helena)

3.3. Extração de DNA

O DNA total foi extraído de tecido muscular usando o kit Wizard® Genomic DNA Purification seguindo as instruções do fabricante, sendo o protocolo adaptado para microtubos de 1,5 ml (Protocolo em Anexo).

3.4 Amplificações via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Fragmentos de três regiões do genoma mitocondrial (rRNA 16S, Citocromo Oxidase Subunidade I e Citocromo *b*) e um íntron do gene nuclear Alfa-tropomiosina (TROPint1) foram usados na presente análise.

O gene COI foi escolhido entre outros por ser flanqueado por sequências conservadas e ser de fácil isolamento e análise, por possuir iniciadores universais estabelecidos e ter maior sinal filogenético que outros genes mitocondriais (AVISE, 1991; SIMON et al., 1994). Além de mostrar valores de distância intraespecíficas menores que interespecíficas, funcionando como um código de barra único para cada espécie (BLAXTER, 2004).

O gene 16S rRNA faz parte da grande subunidade ribossomal do DNA mitocondrial assim como o 12S rRNA (PALUMBI, 1996). Este gene tem se mostrado como um bom marcador na diferenciação de peixes (CIBOIS et al., 1999; SCALLY et

al., 2001) e em estudos comparativos intergenéricos e interespecíficos (FRAGA et al., 2007; CALCAGNOTTO et al., 2005; FRAGA et al., 2014).

O gene Citocromo *b* (Cyt *b*) tem sido bastante utilizado em análises de táxons que divergiram recentemente tais como populações e espécies (FARIAS et al., 2001; SANTOS et al., 2003). O gene contém sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos (MEYER, 1994), sendo eficaz para caracterização genética das espécies.

Alfa-tropomiosina (TROP) é o gene nuclear responsável pela produção de uma proteína a “tropomiosina”, que tem sido utilizado em alguns estudos filogenéticos, mostrando a utilidade e eficácia deste gene em diversos grupos de peixes podendo-se comparar grupos com divergências recentes. (AVELINO et al., 2015; CALCAGNOTTO et al. 2005).

O isolamento e amplificação dos genes deram-se por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), usando-se combinação de *primers* específicos e seguindo condições específicas (Tabela 2) (Protocolo em Anexo).

Tabela 2. Condições de PCR para isolamento dos genes: COI, rRNA 16S, Cyt *b* e TROP.

GENES	PRIMERS	Condições de PCR
COI	COIF1- 5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3' (WARD et al., 2005).	35 ciclos: 94°C por 1' (Desnaturação);
	COIR1- 5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3' (WARD et al., 2005).	50°C por 30" (<i>Anealling</i>); 72°C por 1' (Extensão).
rRNA 16S	16S-L1987 5' GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC 3' (PALUMBI, 1991)	30 ciclos: 94°C por 30" (Desnaturação);
	16S-H2609 5' CCGGTCTGAACCTCAGATCACGT 3' (PALUMBI, 1991)	50°C por 1' (<i>Anealling</i>); 72°C por 2' (Extensão).
Cyt <i>b</i>	L14725 5' CGAAACTAATGACTTGAAAAACCACCGTTG- 3' (SANTOS et al., 2003)	30 ciclos: 94°C por 30" (Desnaturação);
	MVZ16: 5' - AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT - 3' (SMITH; PATTON, 1993)	50°C por 1' (<i>Anealling</i>); 72°C por 2' (Extensão).
TROP	TROP 1'5GAGTTGGATCGGGCTCAGGAGCG3'	30 ciclos: 95°C por 30" (Desnaturação);
	TROP 2'5CGGTCGGCCTCTTCAGCAATGTGCTT3' (FRIESEN et al. 1999)	60°C por 30" (<i>Anealling</i>); 72°C por 45" (Extensão).

3.5. Purificação das amostras amplificadas

Após a amplificação e corrida das amostras em gel de agarose, os produtos da PCR foram purificados com o kit “ExoSap-IT” (USB Corporation) conforme recomendações do fabricante.

3.6. Reação de sequenciamento

Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger et al. (1977) usando-se o Kit “Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). A reação consistiu de um volume final de 7 μ l: 1 μ l do produto amplificado, 0,35 μ l de primer (Forward ou Reverse, 0,8 pmol/ μ l), 0,7 μ l de Big Dye, 1,05 μ l de Tampão 5X para sequenciamento (kit Big Dye) e 3,9 μ l de água de injeção para completar o volume da reação.

As reações de sequenciamento foram realizadas em uma placa com 96 poços, utilizando-se um termociclador com os seguintes ciclos: 35 ciclos de 96°C por 60 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por quatro minutos. Os primers utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação de PCR para amplificação dos produtos (Tabela 2). Ambas as direções (5' e 3') foram sequenciadas conforme exigência para o depósito de sequências *barcoding* na plataforma BoldSystems.

3.7. Precipitação em EDTA/etanol

Após a reação de sequência, as amostras foram precipitadas para retirar do excesso de reagentes não incorporados. O protocolo para precipitação da reação de sequência encontra-se em Anexo.

3.8 Sequenciamento

Após a precipitação, em cada amostra foi adicionado 10 μ l de formamida HI-DI (Applied Biosystems), seguido de uma etapa de desnaturação das amostras a 95°C por dois minutos. Em seguida as amostras foram sequenciadas em sequenciador automático de DNA, modelo ABI 3500/ Life Technologies.

3.9. Análises dos dados

As sequências foram alinhadas no CLUSTAL W 1.4 (THOMPSON et al., 1994) e editadas no BIOEDIT 7.0 (HALL, 1999). Utilizou-se como referência no alinhamento, sequências de *H. malabaricus* retiradas do GenBank (Códigos de Acesso: JX11760, JX11761, JX11762, JX11163 - Argentina; HM405124, HM405122, HM906018, HM906019, HM906020- São Francisco, JX112659 a JX112693 - bacia Amazônica, todas para o gene COI; HQ171346 - gene rRNA 16S; KF530806 a KF530815- gene *Cyt b*; provenientes de Uruguai no Rio Grande do Sul e AY817242-, da coleção de peixes da América do Sul - gene TROP).

Foi verificado o melhor modelo evolutivo para a reconstrução filogenética de cada um dos genes estudados através do programa Modelgenerator 0.85 (KEANE et al. 2006), utilizando-se o critério bayesiano de informação (Bayesian Information Criterion). Posteriormente a escolha do modelo evolutivo, foram geradas árvores filogenéticas através do método de Inferência Bayesiana (IB), obtida pelo programa MrBayes 3.1. 2. (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003).

Para as árvores obtidas através da IB foram rodadas 4 000 000 gerações, com árvores registradas a cada 100 (genes COI e rRNA16S) e 5 000 000 gerações, com árvores registradas a cada 100 (genes *Cyt b* e TROP). A convergência foi checada através do programa Tracer 1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2009) e os primeiros 10% de árvores descartadas como “burn-in” e então uma árvore de consenso foi gerada. O suporte dos ramos foi estimado utilizando o teste de razão de probabilidade aproximada com Shimodaira-Hasegawa-like interpretação (SH-*alrt*), considerado conservativo e menos dispendioso em tempo do que o *bootstrap* (GUINDON et al., 2010; ANISIMOVA et al., 2011).

A árvore concatenada obtida através da IB foram rodadas 4 000 000 gerações, com árvores registradas a cada 100, segundo o modelo de KHY+G, determinado pelo programa Modelgenerator 0.85 (KEANE et al. 2006). As sequências dos marcadores COI, *Cyt b* e rRNA 16S foram concatenadas no programa Mesquite 2.75 (MADDISON; MADDISON, 2011), para se efetuar uma análise filogenética unificada do conjunto de dados compostos pelos três marcadores. O suporte dos ramos foi estimado utilizando o teste de razão de probabilidade aproximada com Shimodaira-Hasegawa-like interpretação (SH-*alrt*), considerado conservativo e menos dispendioso em tempo do que o *bootstrap* (GUINDON et al., 2010; ANISIMOVA et al., 2011).

O programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013) foi usado para gerar a matriz de distância genética entre os espécimes dos rios analisados, considerando-se o modelo evolutivo Kimura – 2 - parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). Uma sequência de *H. intermedius* (HM405123), obtida do GenBank foi incorporada às análises como grupo externo para as análises do gene COI. Foram utilizadas sequências de *Leporinus piau* contidas no banco de dados do GENBIMOL, como outgroup para os genes rRNA 16S, TROP e Cyt *b*.

As redes de haplótipos foram construídas a partir do programa Haploviewer (SALZBURGER et al., 2011). As análises populacionais foram obtidas através dos softwares DNAsp 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009) e ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER et al., 2007). A Análise Molecular de Variância (AMOVA) foi realizada no software ARLEQUIN 3.5 para verificar a existência de diferenciação populacional em diferentes níveis hierárquicos. O índice de Fixação (F_{ST}) foi obtido através de 1023 permutações aleatórias (EXCOFFIER et al., 2007).

A divergência nucleotídica entre e dentro dos haplogrupos foi determinada pela distância *p* não corrigida (rRNA 16S, COI, Cyt *b* e TROP) e pelos parâmetros corrigidos de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) no programa MEGA 6.0. Realizou-se a comparação das sequências nucleotídicas do gene COI obtidas neste estudo com as sequências do banco de dados do BOLDSsystem v.3 (The Barcoding of Life Data System - www.barcodinglife.org) (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007) para verificar a identificação correta dos espécimes de *H. malabaricus*.

4. RESULTADOS

4.1. Gene COI

4.1.1. Análise do polimorfismo do fragmento

Foram obtidas sequências de um fragmento do gene COI do DNA mitocondrial com 630 pb, para 179 espécimes de *H. malabaricus* distribuídos nas bacias analisadas.

Um total de 64 haplótipos foi observado na análise conjunta das amostras, com uma diversidade haplotípica de 0,938, nucleotídica de 0,023 e valor de $K=14,909$. Quando analisadas isoladamente as populações observou-se que os maiores valores de diversidade haplotípica ocorreram para as bacias dos rios Mearim ($h=0,967$) e Parnaíba ($h=0,941$). Os demais valores estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Diversidade genética dos espécimes de *H. malabaricus* de diferentes bacias baseada em 630 pb do gene COI.

Populações	N	NH	K	S	Índice de diversidade molecular	
					Haplotípica (H)	Nucleotídica (π)
Itapecuru	48	8	2,940	16	0,517	0,004
Pindaré	25	11	2,073	12	0,873	0,003
Parnaíba	17	11	9,184	29	0,941	0,014
Mearim	24	18	9,964	24	0,967	0,015
Turiaçu	30	6	0,830	7	0,411	0,001
Amazonas	35	19	24,908	83	0,938	0,039
Populações Agrupadas	179	64	14,909	104	0,938	0,023

(N= número amostral, NH= número de haplótipos, K= número médio de diferenças nucleotídicas, S= sítios polimórficos).

Do total de haplótipos encontrados, 46 correspondem a haplótipos únicos (*singletons*) distribuídos diferentemente entre as bacias e quatro foram compartilhados entre as mesmas, com frequência variando de oito a 11. Destaca-se que um destes haplótipos, com uma frequência de nove vezes, agrupou representantes de todos os rios maranhenses estudados (Itapecuru, Mearim, Pindaré, Parnaíba e Turiaçu), sendo este padrão de distribuição evidenciado na rede de haplótipos (Figura 2). Convém ressaltar que os dois haplótipos mais frequentes, ocorrendo num total de 33 e 23 vezes, foram exclusivos para as populações do rio Itapecuru e Turiaçu, respectivamente. Em relação aos haplótipos amazônicos, revelou-se um padrão de distribuição onde os mesmos formaram linhagens distintas das maranhenses, sem que houvesse compartilhamento de haplótipos entre estas bacias. O número de haplótipos para as populações da bacia amazônica tiveram frequência variando de um a cinco. A análise da rede de haplótipos

permite inferir que existe uma separação incompleta de linhagens, uma vez que, padrão de distribuição dos haplótipos observados não permite separar claramente as populações dos rios entre si, com o compartilhamento de haplótipos entre os mesmos.

4.1.2. Análises filogenéticas e distância genética

A topologia gerada para o gene COI indica a formação de pelo menos 11 haplogrupos bem delimitados, separando os espécimes analisados. Seis destes haplogrupos foram constituídos dos espécimes maranhenses todos com bom suporte estatístico (Figura 3). Onde, considerando-se os haplogrupos maranhenses, o primeiro destes reuniu a maior parte dos espécimes do rio Parnaíba com valor de 1,0/0,95 ($pp = 1,0/0,95$), sendo, portanto, fortemente suportado (haplogrupo V da figura 3). O segundo grupo foi formado pelos espécimes dos rios Mearim e Itapecuru com suporte de 1,0/0,99 ($pp=1,0/0,99$). O terceiro foi formado exclusivamente por quase todos os haplótipos do rio Turiaçu com suporte de 1,0/0,93 ($pp = 1,0/0,93$). O quarto destes haplogrupos considerou os espécimes do rio Pindaré com suporte de 0,96/0,86 ($pp=0,96/0,86$). O quinto agrupamento reuniu os espécimes do rio Mearim e do Pindaré com suporte de 0,96/0,85 ($pp=0,96/0,85$). Os espécimes dos rios Itapecuru, Mearim e Pindaré, formaram um haplogrupo com suporte de 0,65/0,60 ($pp=0,65/0,60$). Os resultados obtidos permitiram inferir que as populações maranhenses formaram agrupamentos parafiléticos, apresentado pelo menos duas linhagens diferenciadas para cada bacia estudada (Figura 3).

Analisando os demais haplogrupos, verificou-se que os espécimes da Argentina formaram um clado isolado e exclusivo com forte suporte estatístico (1,0 - $pp = 1$). Em relação aos espécimes do rio Amazonas, estes se dividiram em quatro haplogrupos com suporte variando de 0,89 ($pp=0,89$) a 1,0 ($pp = 1$), demonstrando claramente a ocorrência de quatro linhagens diferentes para esta bacia. Sendo que uma dessas linhagens mostrou-se mais próxima dos espécimes maranhenses, formando um agrupamento com suporte de 0,9 ($pp = 0,90$). Nota-se também a ocorrência de uma linhagem mais basal com bom suporte estatístico 1,0 ($pp = 1$) onde a mesma apresentou-se isolada das demais linhagens analisadas no presente estudo. O haplogrupo formado pelos espécimes do rio São Francisco mostrou valor estatístico de 0,95 ($pp = 0,95$), sendo fortemente suportado (Figura 3).

Figura 2. Rede de haplótipos gerada para populações de *H. malabaricus* provenientes das bacias maranhenses e amazônica com base no gene COI. O tamanho dos círculos foi proporcional à frequência com que os haplótipos ocorreram.

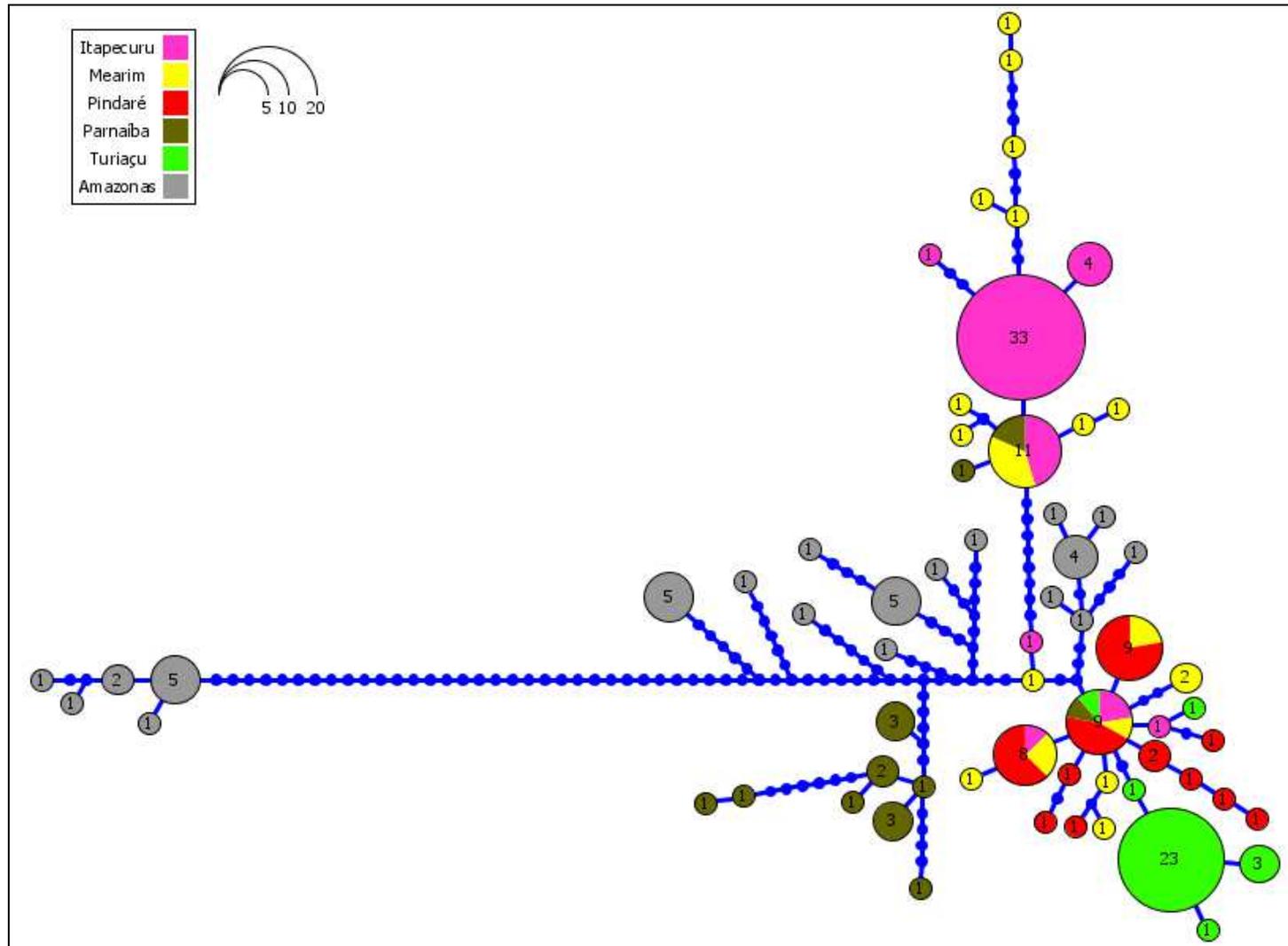
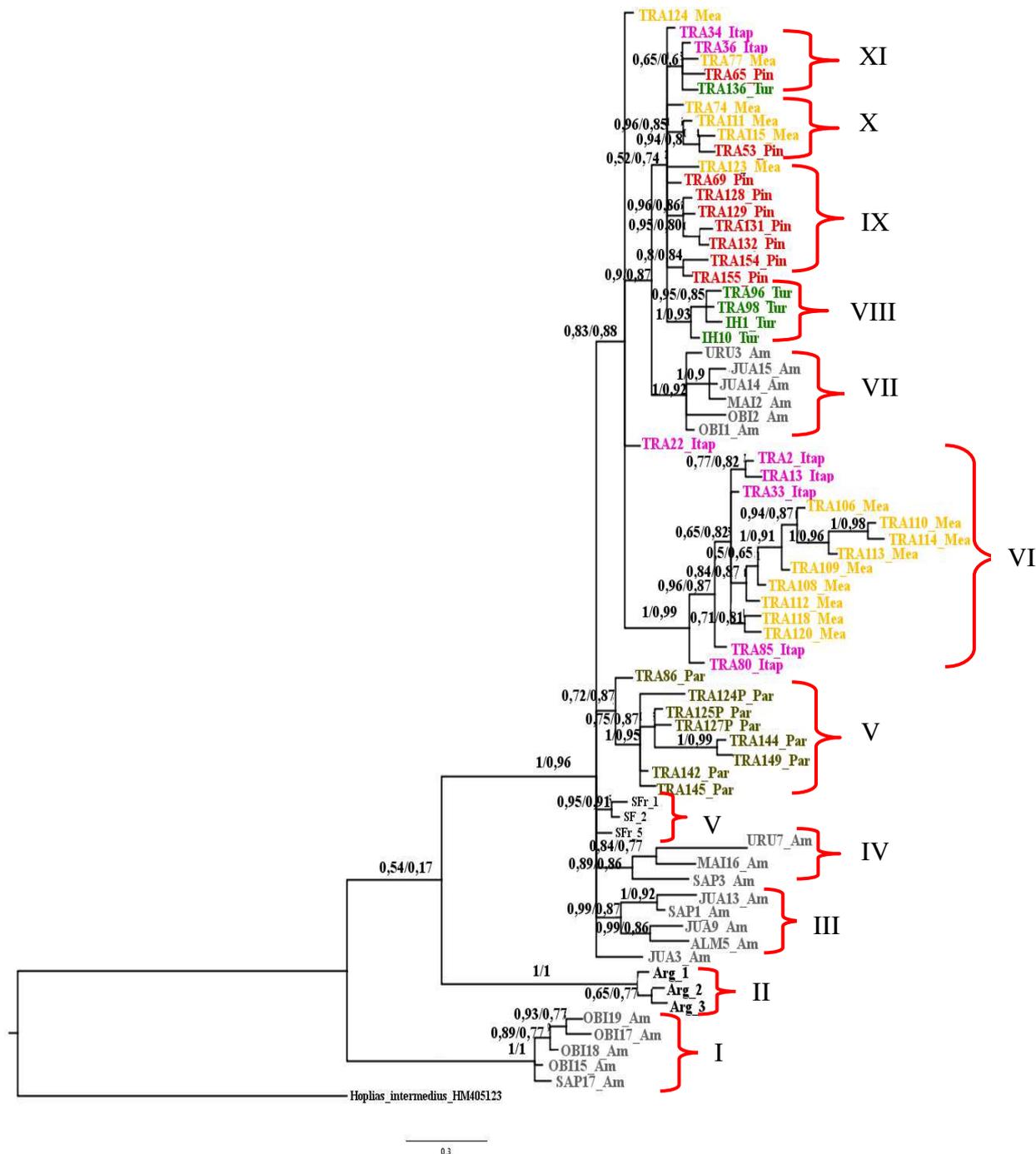


Figura 3. Árvore de haplótipos para o gene COI obtida através do modelo GTR+I+G, rodadas 4 000 000 gerações. O suporte dos ramos foi estimado através do teste aproximado de verossimilhança “Shimodaira-Hasegawa-like interpretation”. Os números nos ramos indicam da esquerda para a direita os valores de IB e MV.



A distância genética média entre os grupos variou de 7,9 a 8,1% quando comparados os haplótipos brasileiros com os provenientes da Argentina, o que foi evidenciado também na árvore de haplótipos, onde estes não se agruparam com os espécimes brasileiros. Em relação aos espécimes maranhenses, os valores variaram de

0,7 a 2,5%. A comparação dos espécimes maranhenses com os provenientes do rio Amazonas apresentou valor médio de 4% (Tabela 4). A diversidade média intraespecífica variou de 0,5 a 4,2%.

Tabela 4. Média de distância genética K2P para o gene COI nas populações de *H. malabaricus*. Os valores em diagonal correspondem à diversidade média intraespecífica.

Populações	% Distância Genética							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Itapecuru	0,5							
2. Mearim	1,4	1,6						
3. Pindaré	2,2	1,6	0,3					
4. Parnaíba	2,4	2,3	1,9	1,5				
5. Turiaçu	2,5	1,9	0,7	2,2	0,1			
6. Argentina	8,1	7,9	7,4	7,5	7,9	0,3		
7. São Francisco	2,5	2,3	1,5	1,3	1,8	7,3	0,2	
8. Amazonas	4,3	4,1	3,4	3,8	3,7	7,9	3,4	4,2

4.1.3. Análise Molecular de Variância (AMOVA)

Os testes de AMOVA mostraram que a maior variação ocorreu dentro das populações com *Fst* e valores de *p* significativos. Para as populações maranhenses, a maior variação ocorreu entre as populações (64,01%) (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados da AMOVA nas populações de *H. malabaricus* analisadas.

Tipos de variação	Componentes de Variação	% Total de Variação	<i>Fst</i> Estatístico	<i>p</i>
Quatro grupos (rios maranhenses, rio São Francisco, Amazonas e rio Prata)				
Entre grupos	255.496 Va	24,89	0,608	<0,0001
Entre populações dentro dos grupos	369.361Vb	35,99		
Dentro das populações	401.544 Vc	39,12		
Grupo Nordeste (rios maranhenses + São Francisco, Amazonas e rio Prata)				
Entre grupos	270.773 Va	25,84	0,616	<0,0001
Entre populações dentro dos grupos	375.694Vb	35,85		
Dentro das populações	401.544 Vc	38,31		
Grupo Maranhão (Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba, Turiaçu)				
Entre populações	376.183Va	64,01	0,640	<0,001
Dentro das populações	211.547Vb	35,99		

*valores de *p*, calculados aleatoriamente com 1023 permutações.

4.1.4. Análise no BOLDSystems

Para verificar a identificação correta dos espécimes foi realizada a comparação das sequências nucleotídicas obtidas no presente trabalho com as sequências depositadas no banco de dados do BOLDSystems (*The Barcode of Life Data System*) (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). A identificação dos espécimes através da plataforma do BOLDSystems variou de 99,50% a 100% de similaridade com a espécie *H. malabaricus* (Tabela 6). A posição taxonômica no BOLD para cada indivíduo foi confirmada com aquela descrita por Bloch (1794), sendo definida como *H. malabaricus*.

Tabela 6. Identificação molecular dos haplótipos mais frequentes de *H. malabaricus* realizada através de comparações de sequências obtidas dos rios maranhenses com sequências disponíveis na plataforma BOLDSystems.

Morfológica	Molecular	Localidade	Código	Similaridade (%)
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Itapecuru	TRA 2	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Itapecuru	TRA 14	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Itapecuru	TRA 25	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Itapecuru	TRA 43	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Itapecuru	TRA 83	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Mearim	TRA 62	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Mearim	TRA 63	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Mearim	TRA 64	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Mearim	TRA 74	99,84
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Mearim	TRA 107	99,84
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Mearim	TRA 116	99,84
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Pindaré	TRA 54	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Pindaré	TRA 58	99,84
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Pindaré	TRA 66	99,84
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Pindaré	TRA 67	99,84
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Pindaré	TRA 71	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Parnaíba	TRA 84	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Parnaíba	TRA 86	99,50
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Parnaíba	TRA 93	99,50
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Parnaíba	TRA 94	100
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Parnaíba	TRA 95	99,50
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Turiaçu	TRA 97	99,67
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Turiaçu	TRA 98	99,67
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Turiaçu	TRA 99	99,67
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Turiaçu	TRA 137	99,67
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	Turiaçu	TRA 140	99,67

4.2. Gene Cyt b

4.2.1. Análise do polimorfismo do fragmento e Diversidade genética

A análise de um total de 150 sequências com 800pb revelou a presença de 75 haplótipos com diversidade haplotípica de 0,958 e nucleotídica de 0,023, com valor de K de 18,784. O maior índice de diversidade haplotípica considerando-se os rios maranhenses foi obtido para o rio Mearim onde foram encontrados 44 sítios polimórficos, 17 haplótipos com diversidade haplotípica de $h = 0,972$. Os níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica obtidos para as demais populações estão sumarizados na Tabela 7.

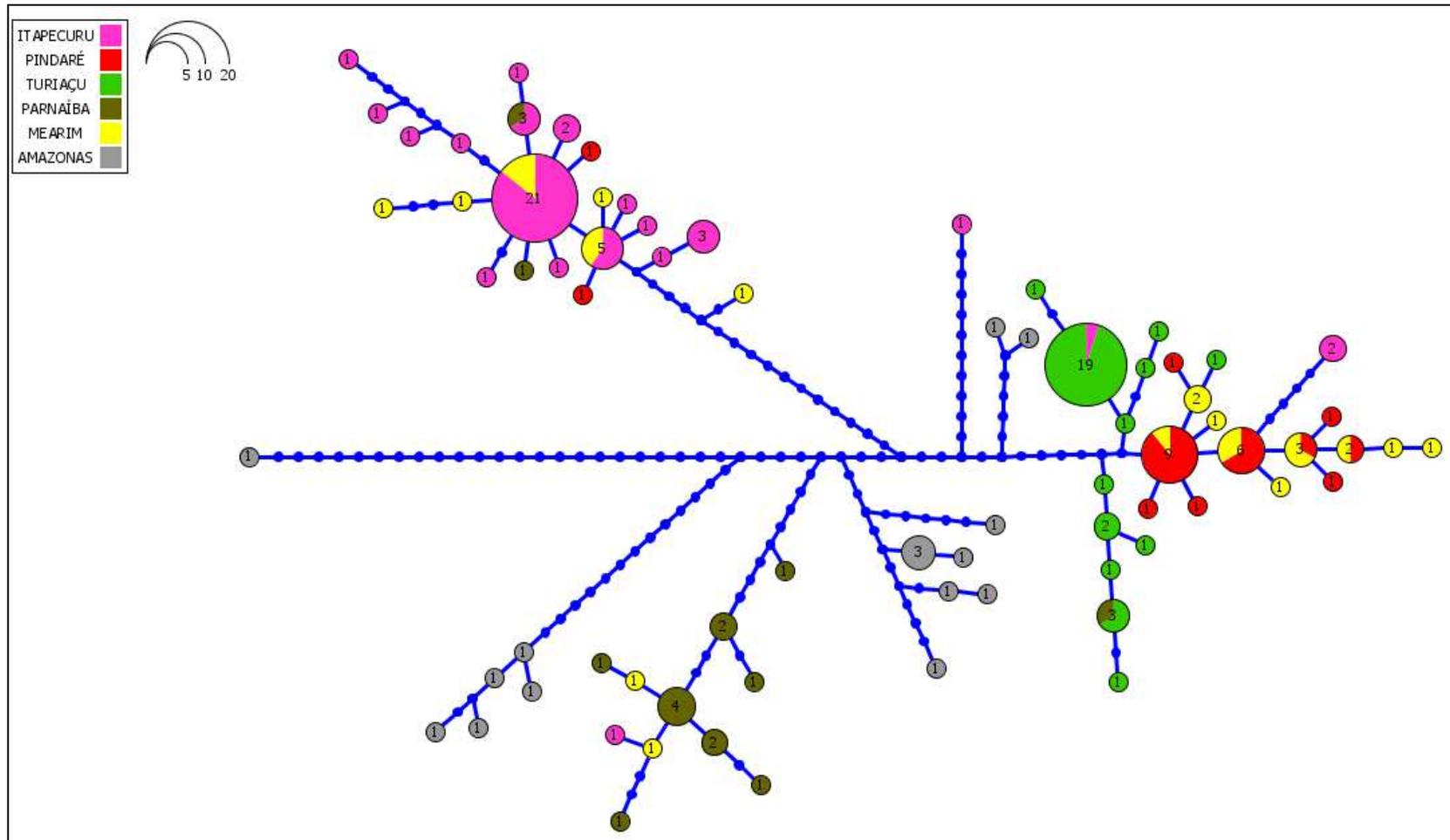
Tabela 7. Diversidade genética dos espécimes de *H. malabaricus* baseado em 800 pb do gene Cyt b.

Populações	N	NH	K	S	Índice de diversidade molecular	
					Haplotípica (H)	Nucleotídica (π)
Itapecuru	43	19	7,316	65	0,821	0,009
Pindaré	21	11	6,457	31	0,838	0,008
Parnaíba	16	11	11,433	32	0,933	0,014
Mearim	23	17	17,731	44	0,972	0,022
Turiaçu	31	12	0,667	12	0,667	0,002
Amazonas	16	14	17,875	65	0,975	0,022
Populações Agrupadas	150	75	18,784	115	0,958	0,023

(N= número amostral, NH= número de haplótipos, K= número médio de diferenças nucleotídicas, S= sítios polimórficos).

Do total de haplótipos encontrados, 56 correspondem a haplótipos únicos (*singletons*) distribuídos diferentemente entre as bacias analisadas e oito foram compartilhados entre as bacias, com frequência variando de dois a 21. Destaca-se que destes haplótipos quatro agruparam representantes dos rios Pindaré e Mearim, com frequência variando de dois a quatro. Convém ressaltar que os dois haplótipos mais frequentes ocorreram num total de 21 e 19 vezes. O primeiro mais frequente agrupou a população dos rios Itapecuru e Mearim, enquanto que o segundo reuniu espécimes dos rios Turiaçu e Itapecuru. A rede de haplótipos gerada exibiu um padrão de distribuição dos espécimes amazônicos formado de haplótipos únicos ou haplótipos exclusivos para as populações analisadas, separados dos haplótipos maranhenses por muitos passos mutacionais (Figura 4).

Figura 4. Rede de haplótipos gerada para populações de *H. malabaricus* provenientes das bacias maranhenses e amazônica com base no gene *Cyt b*. O tamanho dos círculos foi proporcional à frequência com que os haplótipos ocorreram.



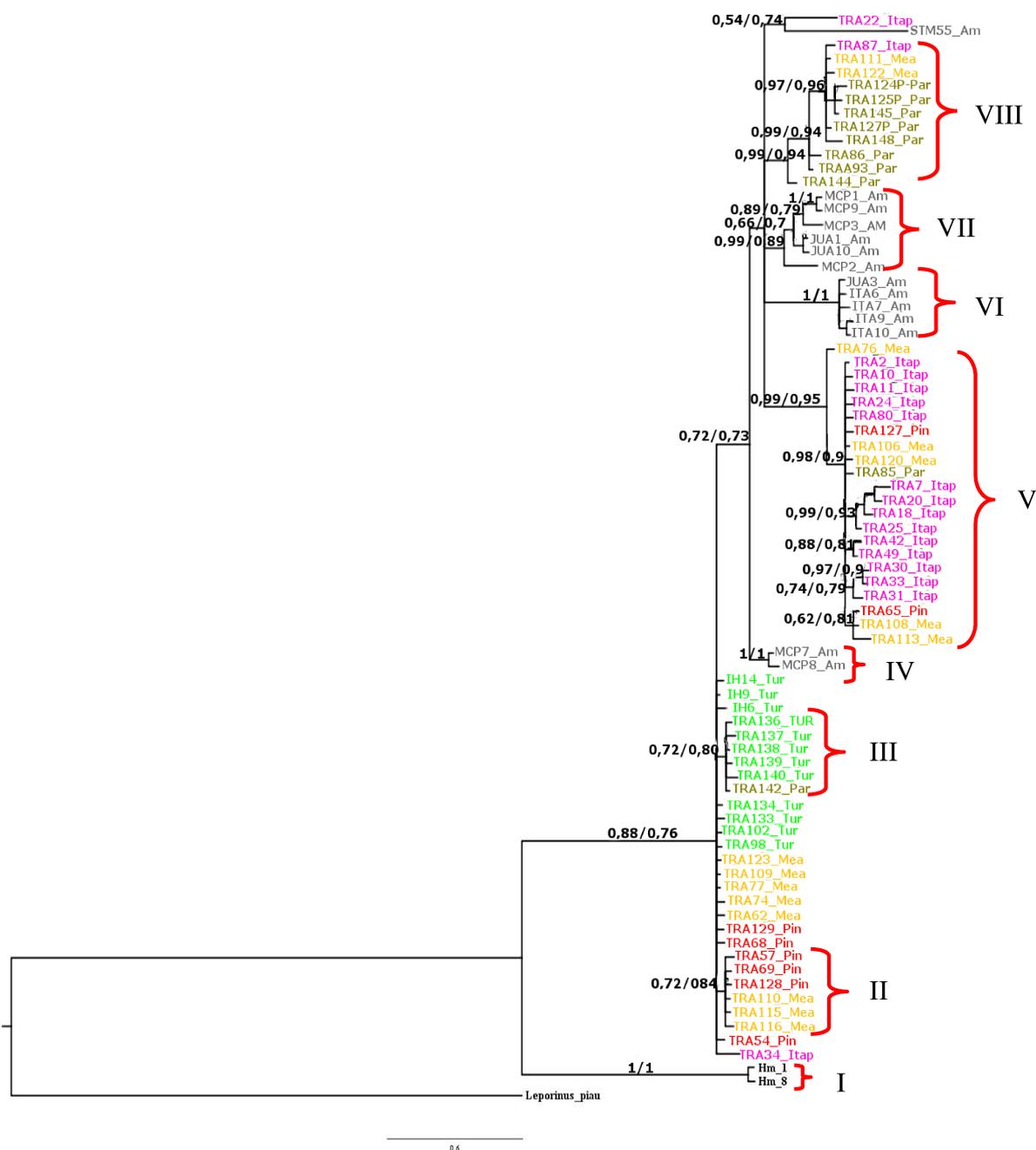
4.2.2. Análises filogenéticas e distância genética

Os resultados mostraram o agrupamento dos espécimes em cinco quatro maiores para as populações maranhenses, separando-as das populações do Genbank, proveniente da bacia do rio Uruguai (Figura 6), que formaram um clado isolado. Os haplogrupos tiveram os suportes variando de 0,72 (pp = 0,72) a 1,0 (pp = 1,0), estando a maioria bem suportados.

A análise revelou a presença de pelo menos oito haplogrupos, destes o primeiro foi formado pelos haplótipos do Genbank, com suporte de 1,0/1,0 (pp = 1,0/1,0), onde o mesmo não agrupou com nenhum dos espécimes maranhenses presentes na análise. O segundo haplogrupo agrupou haplótipos dos rios Pindaré, Mearim e haplótipo do rio Itapecuru com suporte de 0,72/0,84 (pp = 0,72/0,84). O terceiro agrupamento foi formado por todos os espécimes do rio Turiaçu e um do rio Parnaíba, sendo suportado pelo valor de 0,72/0,80 (pp = 0,72/0,80). O quarto haplogrupo foi formado pelos haplótipos do rio Amazonas, com suporte de 1,0/1,0 (pp = 1,0/1,0). O quinto foi constituído por espécimes das populações dos rios Itapecuru, Mearim, dois haplótipos do rio Pindaré e um indivíduo do rio Parnaíba com suporte de 0,98/0,90 (pp = 0,98/0,90). Tanto o sexto quanto o sétimo agrupamento reuniram espécimes do rio Amazonas com suporte de 1,0/1,0 (pp = 1,0/1,0) e 0,99/0,98 (pp = 0,99/0,98), respectivamente. Em relação ao oitavo agrupamento, este reuniu espécimes do rio Parnaíba, juntamente com dois espécimes do rio Mearim e um do rio Itapecuru com suporte de 0,97/0,96 (pp = 0,97/0,96) (Figura 5).

Os resultados observados na árvore são um claro indicativo de politomia das amostras com separação incompleta das linhagens reforçada pela ocorrência de haplótipos compartilhados. As divisões apresentadas na árvore de haplótipos permitiu observar a presença de três linhagens para as bacias dos rios Itapecuru, Mearim e Parnaíba, duas linhagens para o rio Pindaré e uma linhagem para o rio Turiaçu, confirmando a diversidade genética nesse complexo de espécies.

Figura 5. Árvore de haplótipos para o gene *Cyt b* obtida através do modelo GTR+I+G, rodadas 5 000 000 gerações. O suporte dos ramos foi estimado através do teste aproximado de verossimilhança “Shimodaira-Hasegawa-like interpretation”. Os números nos ramos indicam da esquerda para a direita os valores de IB e MV.



A distância genética média entre os grupos variou de 10 a 11,5% quando comparados os haplótipos maranhenses com os do rio Uruguai, no Rio Grande do Sul, provenientes do Genbank, mostrando clara diferenciação, o que foi evidenciado também na árvore de haplótipos, onde estes não se agruparam com os espécimes maranhenses. Em relação aos espécimes maranhenses, os valores variaram de 0,9 a 3,4%, com a

população do rio Turiaçu sendo a mais diferenciada. Convém ressaltar a grande diferenciação das amostras maranhenses quando comparadas aquelas provenientes do rio Uruguai (10 a 11,5%). A diversidade média intraespecífica variou de 0,5 a 4,2%. Os demais valores de divergência obtidos para as populações estão sumarizados na Tabela 8. A diversidade média intraespecífica variou de 0,8 a 3,9.

Tabela 8. Média de distância genética K2P para o gene *Cyt b* nas populações de *H. malabaricus*. Os valores em diagonal correspondem à diversidade média intraespecífica.

Populações	% Distância Genética					
	1	2	3	4	5	6
1. Itapecuru	0,9					
2. Pindaré	3,2	0,8				
3. Mearim	2,4	1,9	2,3			
4. Turiaçu	3,4	0,9	2,0	2,0		
5. Parnaíba	3,1	2,9	2,9	2,7	1,5	
6. Amazonas	3,4	3,0	3,1	2,8	2,3	
7. Uruguai	11,5	10,4	10,9	10,0	10,8	3,9

4.2.3. Análise Molecular de Variância (AMOVA)

Os resultados dos testes de AMOVA mostraram que a maior porcentagem de variação genética ocorreu entre os grupos (46,79%) considerando-se o primeiro teste e entre as populações (59,58%) considerando-se o segundo teste com valores de *p* e *Fst* (0,753 e 0,595, respectivamente) altamente significativo, sendo indicativo de um processo de diferenciação genética em curso nas populações dos rios estudados (Tabela 9).

Tabela 9. Resultados da AMOVA nas populações de *H. malabaricus* analisadas.

Tipos de variação	Componentes de Variação	% Total de Variação	<i>Fst</i> Estatístico	<i>p</i>
Dois grupos (rios maranhenses e rio Uruguai)				
Entre grupos	977.603Va	46,79	0,753	<0,0001
Entre populações dentro dos grupos	599.625Vb	28,56		
Dentro das populações	514.921Vc	24,65		
Grupo Maranhão (Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba, Turiaçu)				
Entre populações	600.759Va	59,58	0,595	<0,001
Dentro das populações	407.571Vb	40,42		

*valores de *p*, calculados aleatoriamente com 1023 permutações.

4.3. Gene rRNA 16S

4.3.1. Análise do polimorfismo do fragmento e Diversidade genética

Na análise de 161 sequências de um fragmento do gene rRNA 16S com 564pb observou-se a formação de 65 haplótipos com diversidade haplotípica de 0,941 e nucleotídica de 0,014, com valor de $K= 8,181$. Com 557 sítios conservados e 77 variáveis, destes 52 foram informativos para parcimônia. Observando os resultados encontrados notou-se que o maior índice de diversidade haplotípica foi para a população do rio Mearim ($h= 0,947$) para 14 haplótipos. Os níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica obtidos para as demais populações estão sumarizados na Tabela 10.

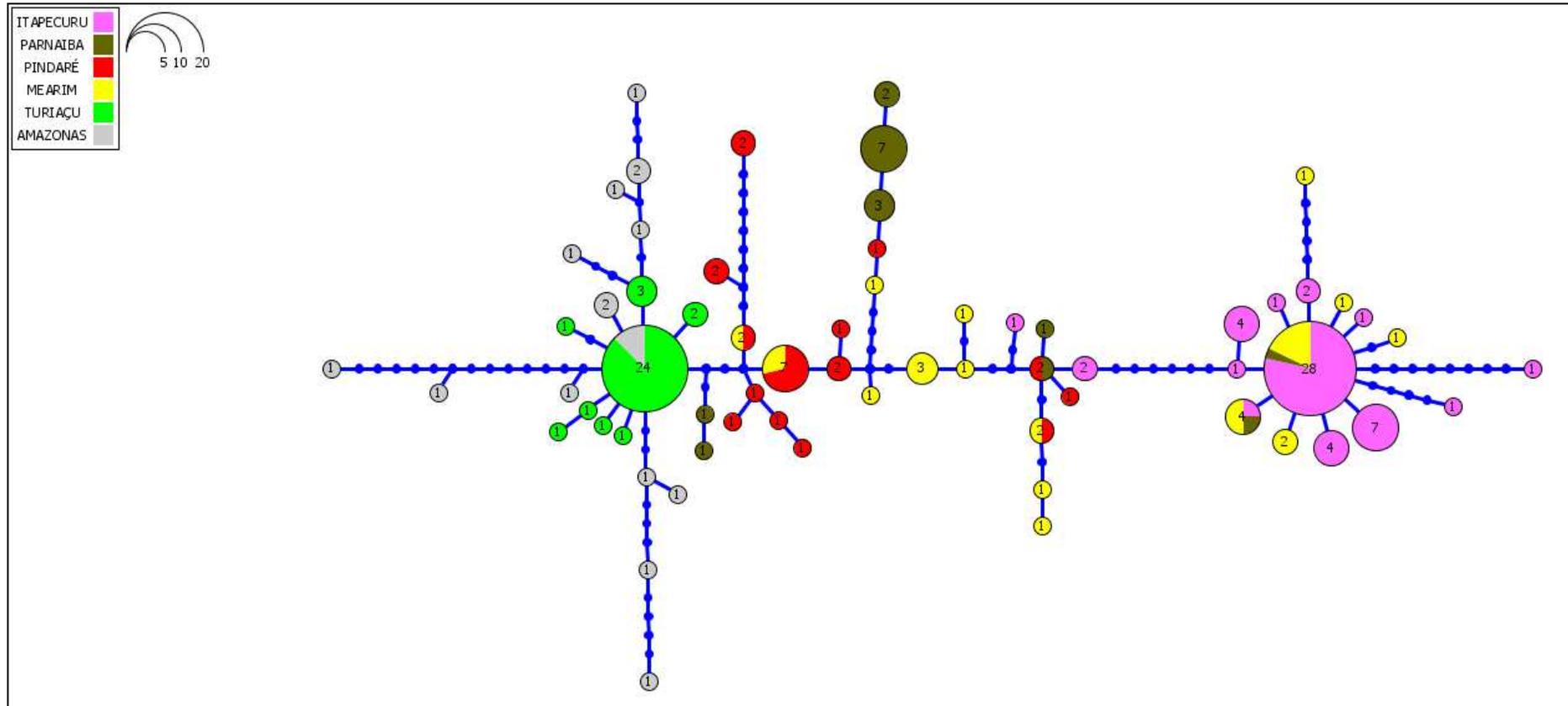
Tabela 10. Diversidade genética dos espécimes de *H. malabaricus* baseado em 564 pb do gene rRNA 16S.

Populações	N	NH	K	S	Índice de diversidade molecular	
					Haplotípica (H)	Nucleotídica (π)
Itapecuru	48	13	2,252	21	0,764	0,004
Pindaré	21	14	4,838	20	0,938	0,008
Parnaíba	18	9	5,294	17	0,837	0,009
Mearim	14	7	5,011	14	0,824	0,008
Turiaçu	22	4	0,511	3	0,398	0,001
Amazonas	18	14	7,373	35	0,967	0,013
Populações Agrupadas	161	65	8,181	77	0,941	0,014

(N= número amostral, NH= número de haplótipos, K= número médio de diferenças nucleotídicas, S= sítios polimórficos).

Dos 65 haplótipos encontrados os dois mais frequentes ocorreram num total de 28 e 24 vezes, respectivamente. O primeiro mais frequente agrupou espécimes dos rios Itapecuru, Mearim e Parnaíba e o segundo reuniu espécimes do rio Turiaçu e da bacia amazônica. Do total de haplótipos encontrados, 41 correspondem a haplótipos únicos (*singletons*) distribuídos diferentemente entre as bacias. A rede de haplótipos ilustrada na figura 6 mostra a presença de haplótipos exclusivos, porém apresenta sete haplótipos compartilhados, onde três destes agruparam os espécimes dos rios Mearim + Pindaré, dois agruparam espécimes dos rios Itapecuru + Mearim + Parnaíba. Houve ainda compartilhamento de haplótipos entre os rios Pindaré + Parnaíba e entre Turiaçu + Amazonas (Figura 6). Deve-se destacar que a bacia amazônica mostrou linhagens diferenciadas, onde uma delas compartilhou haplótipos com o rio Turiaçu, mostrando-se proximamente relacionadas.

Figura 6. Rede de haplótipos gerada para populações de *H. malabaricus* provenientes das bacias maranhenses e amazônica com base no gene rRNA 16S.



4.3.2. Análises filogenéticas e distância genética

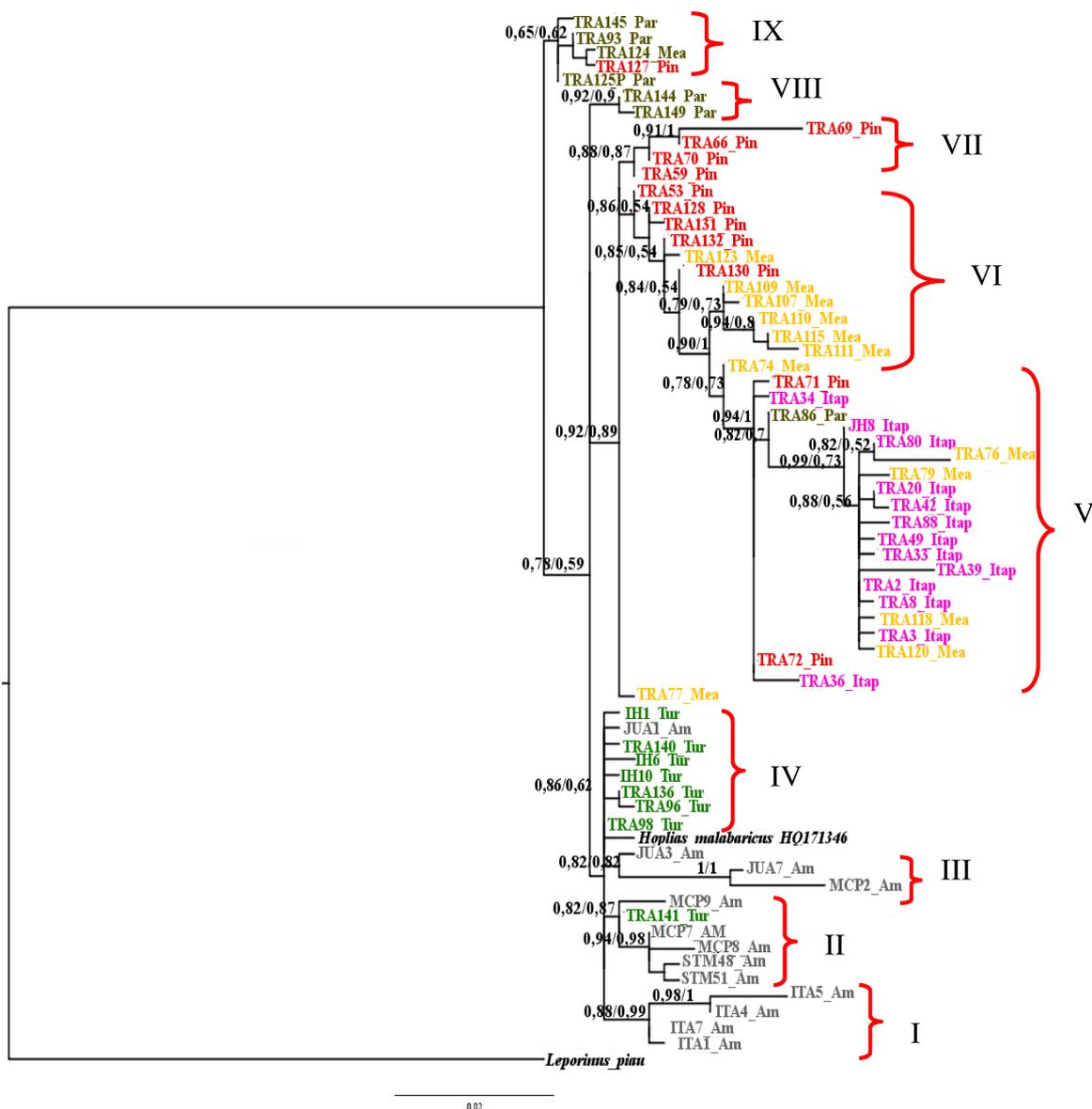
A análise da árvore revelou a ocorrência de seis haplogrupos maiores para as populações maranhenses de *H. malabaricus*. O primeiro deles foi formado por espécimes do rio Turiaçu com valor de suporte de 0,86/0,62 (pp = 0,86/0,62). O segundo reuniu espécimes dos rios Pindaré, Itapecuru, Mearim e um espécime do rio Parnaíba com valor de suporte de 0,94/1,0 (pp = 0,94/1,0). O terceiro agrupou haplótipos do rio Mearim e Pindaré com suporte de 0,88/0,87 (pp = 0,86/0,54). O quarto haplogrupo reuniu espécimes do rio Pindaré com suporte estatístico de 0,88/0,87 (pp = 0,88/0,87), o quinto agrupamento, reuniu espécimes do rio Parnaíba com suporte estatístico de 0,92/0,90 (pp = 0,92/0,90). O sexto agrupamento reuniu espécimes do rio Parnaíba, Mearim e Pindaré com valores de 0,65/0,62 (Figura 7). Observou-se ainda que os espécimes provenientes da bacia do rio Amazonas formaram três haplogrupos com suporte de pp = 0,82/0,82 , pp = 0,94/0,98 e 0,88/0,99. As divisões apresentadas na árvore de haplótipos permitiu observar a presença de duas linhagens para as bacias dos rios Itapecuru, três para os rios Mearim e Pindaré, quatro linhagens para o rio Parnaíba e uma linhagem para o rio Turiaçu, confirmando a diversidade genética nesse complexo de espécies.

A distância genética média entre os espécimes maranhenses mostrou valores variando de 1 a 2%. Quando comparados os espécimes maranhenses com aqueles provenientes do Amazonas, os valores de divergência variaram de (0,8 a 2,7%), sendo mais próxima das populações do rio Turiaçu, confirmando o padrão encontrado nas árvores de haplótipos construídas. A diversidade média intraespecífica variou de 0,1 a 1,3%. Os demais valores de divergência encontrados para as populações estão sumarizados na tabela 11.

Tabela 11. Média de distância genética K2P para o gene rRNA 16S nas populações de *H. malabaricus*. Os valores em diagonal correspondem à diversidade média intraespecífica.

Populações	% Distância Genética					
	1	2	3	4	5	6
1. Itapecuru	0,4					
2. Mearim	1	1,1				
3. Pindaré	2	1,5	0,9			
4. Parnaíba	2	1,7	1,4	1,0		
5. Turiaçu	2	1,6	1,2	1,1	0,1	
6. Amazonas	2,7	2,3	1,9	1,8	0,8	1,3

Figura 7. Árvore de haplótipos do gene rRNA 16S através do modelo GTR+I+G, rodadas em 4.000.000 gerações. O suporte dos ramos foi estimado através do teste aproximado de verossimilhança “Shimodaira-Hasegawa-like interpretation”. Os números nos ramos indicam da esquerda para a direita os valores de IB e MV.



4.3.3. Análise Molecular de Variância (AMOVA)

A análise de variância molecular (AMOVA) realizada nos dois testes demonstrou que a maior variância ocorre entre as populações (56,33 e 61,15%) com F_{ST} (0,594 e 0,611, respectivamente) e valor de p altamente significativo ($p < 0,0001$) (Tabela 12).

Tabela 12. Resultados da AMOVA nas populações de *H. malabaricus* analisadas.

Tipos de variação	Componentes de Variação	% Total de Variação	Fst Estatístico	p
Dois grupos (rios maranhenses e Amazonas)				
Entre grupos	014.679Va	3,12	0,594	<0,0001
Entre populações dentro dos grupos	264.934Vb	56,33		
Dentro das populações	190.745Vc	40,55		
Grupo Maranhão (Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba, Turiaçu)				
Entre populações	265.728Va	61,15	0,611	<0,001
Dentro das populações	168.832Vb	38,85		

*valores de *p*, calculados aleatoriamente com 1023 permutações.

4.4. Gene TROP

4.4.1. Análise do polimorfismo do fragmento e diversidade genética

Foram obtidas sequências do gene nuclear TROP de 151 exemplares de *H. malabaricus*, com o tamanho do fragmento de 490 pb. A análise revelou que o maior índice de diversidade haplotípica foi observado para a população do rio Mearim ($h=1,000$), seguida do rio Pindaré ($h = 0,993$). Os demais valores obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 13.

Tabela 13. Diversidade genética dos espécimes de *H. malabaricus* baseado em 490 pb do gene TROP.

Populações	N	NH	K	S	Índice de diversidade molecular	
					Haplotípica (H)	Nucleotídica (π)
Itapecuru	42	17	4,708	96	0,942	0,023
Pindaré	24	22	16,967	51	0,993	0,034
Parnaíba	16	11	3,983	17	0,875	0,008
Mearim	15	15	10,914	32	1,000	0,022
Turiaçu	29	16	5,318	26	0,916	0,010
Amazonas	25	13	15,340	65	0,837	0,031
Populações Agrupadas	151	85	11,301	62	0,942	0,023

(**N**= número amostral, **NH**= número de haplótipos, **K**= número médio de diferenças nucleotídicas, **S**= sítios polimórficos).

Dos 85 haplótipos encontrados os dois mais frequentes ocorreram num total de 34 e 10 vezes, respectivamente. O primeiro mais frequente agrupou todas as populações presentes dos rios maranhenses e amostras do rio Amazonas. O segundo mais frequente reuniu espécimes do rio Amazonas. Do total de haplótipos encontrados, 70 correspondem a haplótipos únicos (*singletons*) distribuídos diferentemente entre as bacias. A rede apresentada na Figura 8 ilustra a distribuição dos haplótipos obtidos, com

apenas dois haplótipos compartilhados entre bacias, o haplótipo com maior frequência, formado por espécimes maranhenses + amazônico e o segundo entre os rios Parnaíba + Pindaré. Embora haja ocorrência de compartilhamento de haplótipos entre os rios maranhenses e o rio Amazonas, as linhagens amazônicas mostraram - se diferenciadas entre si e da maioria das populações maranhenses.

4.4.2. Análises filogenéticas e distância genética

A árvore obtida apresentou clados com valores menos suportados que as demais, porém com a mesma formação de quatro haplogrupos. O primeiro deles foi formado por espécimes do rio Parnaíba com suporte de 0,87 (pp = 0,87). O segundo reuniu haplótipos do rio Pindaré com suporte de 1,0 (pp = 1,0). Em relação ao terceiro, este agrupou espécimes do rio Mearim com 0,85 (pp = 0,85). O quarto foi formado por espécimes do rio Turiaçu com suporte de 1,0 (pp = 1,0). Em relação aos haplogrupos formados pelo rio Amazonas, estes se apresentaram com suporte variando de 0,99 (pp = 0,99) e 1,0 (pp = 1,0), mantendo o mesmo padrão encontrado para os outros genes (Figura 9).

A matriz de distância genética é mostrada na Tabela 14. Quando comparados os espécimes maranhenses entre si, os valores de divergência variaram de 1 a 4%, confirmando o padrão encontrado nas árvores de haplótipos construídas, onde foi possível observar uma variação genética bem evidenciada entre as populações. A diversidade média intraespecífica variou de 1,0 a 4,0%. Os demais valores de divergência encontrados para as populações estão sumarizados na tabela 14.

Tabela 14. Percentual médio de divergência nucleotídica gerada através do programa Mega 6 para o gene TROP nas populações de *H. malabaricus*.

Populações	% Distância Genética					
	1	2	3	4	5	6
1. Itapecuru	1,0					
2. Pindaré	3,0	4,0				
3. Mearim	2,0	3,0	2,0			
4. Parnaíba	1,0	3,0	2,0	1,0		
5. Turiaçu	1,0	4,0	2,0	1,1	1,0	
6. Amazonas	3,0	5,0	4,0	3,0	3,0	3,0

Figura 8. Rede de haplótipos gerada para populações de *H. malabaricus* provenientes das bacias maranhenses e amazônica com base no gene TROP.

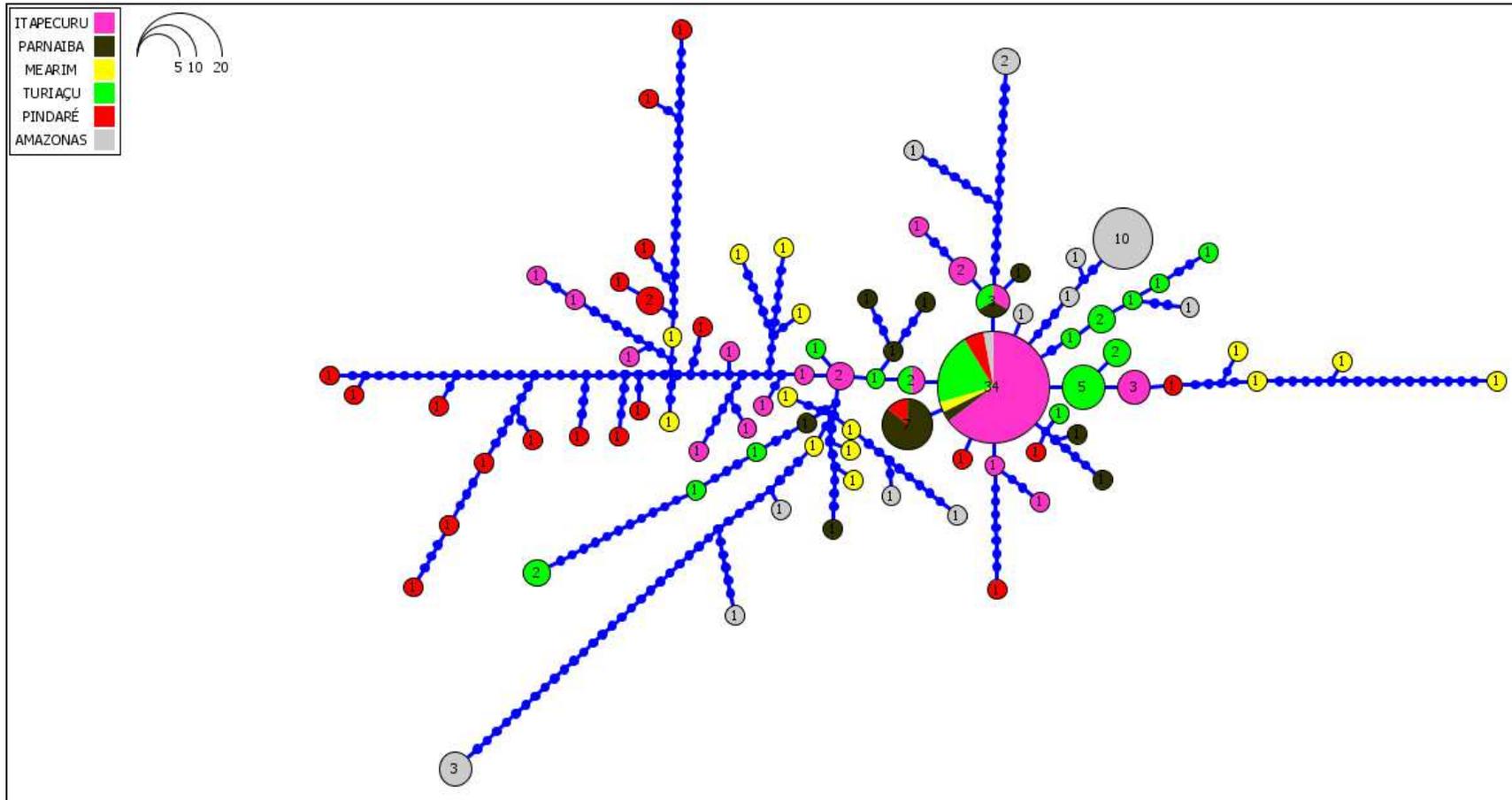


Figura 9. Árvore de haplótipos do gene TROP através do modelo GTR+I+G, rodadas 5.000.000 gerações. O suporte dos ramos foi estimado através do teste aproximado de verossimilhança “Shimodaira-Hasegawa-like interpretation”.



4.4.3. Análise Molecular de Variância (AMOVA)

A análise de variância molecular (AMOVA) realizada nos dois testes mostrou que a maior variância ocorreu dentro das populações (74,19 e 75,07%) com *Fst* (0,258 e 0,251, respectivamente) e valor de *p* altamente significativo ($p < 0,0001$) (Tabela 15).

Tabela 15. Resultados da AMOVA nas populações de *H. malabaricus* analisadas para o gene TROP.

Tipos de variação	Componentes de Variação	% Total de Variação	Fst Estatístico	p
Dois grupos (rios maranhenses e Amazonas)				
Entre grupos	030.410Va	4,98	0,258	<0,0001
Entre populações dentro dos grupos	127.070Vb	20,82		
Dentro das populações	452.726Vc	74,19		
Grupo Maranhão (Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba, Turiaçu)				
Entre populações	129.643Va	24,93	0,251	<0,001
Dentro das populações	390.390Vb	75,07		

*valores de *p*, calculados aleatoriamente com 1023 permutações.

4.5. Análise dos dados concatenados

Para ratificar os dados anteriores, construiu-se uma topologia com as sequências contínuas dos genes *Cyt b*, *COI* e *rRNA 16S* (1695pb), concatenados de maneira que a história evolutiva dos espécimes fosse representada. A árvore gerada, a partir de 155 espécimes, resumiu as topologias individualizadas de cada gene, apresentando-se ramificada e com politomia dos ramos, evidenciando padrão semelhante daqueles obtidos individualmente na construção das árvores dos genes isolados, indicando separação incompleta das linhagens (Figura 10).

A análise da árvore revelou a ocorrência de diferentes linhagens para as populações maranhenses de *H. malabaricus*, confirmando o padrão obtido nas análises dos genes de maneira individualizada, onde os mesmos mostraram a seguinte diferenciação: três linhagens para a população do rio Itapecuru, três para o rio Mearim, uma para os rios Pindaré e Turiaçu e duas para o rio Parnaíba (gene *COI*); duas linhagens para o rio Itapecuru, três para o rio Mearim, duas para o rio Pindaré, uma para o rio Turiaçu e quatro para o rio Parnaíba (gene *rRNA16S*) e quatro linhagens para o rio Itapecuru, três para os rios Mearim e Parnaíba, duas para o rio Pindaré e uma para o rio Turiaçu. O padrão de distribuição dos espécimes apresentados na árvore concatenada é mais um indicativo de diferenciação das populações de *H. malabaricus* para os rios maranhenses e uma forte evidência de estruturação genética das mesmas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Identificação Molecular

Diversos estudos utilizando marcadores cromossômicos e moleculares têm mostrado alta diversidade cariotípica e genética em *H. malabaricus*, indicando tratar-se de um complexo de espécies (BERTOLLO et al., 1997; BERTOLLO et al., 2000; DERGAM et al., 2002; VICARI et al., 2005; CIOFFI et al., 2009; ROSA et al., 2009; SANTOS et al., 2009; BLANCO et al., 2010; MARQUES et al., 2013; PEREIRA et al., 2013).

A identificação molecular dos espécimes analisados, a partir da comparação de nossas sequências do gene COI com aquelas depositadas na plataforma BOLDSystems, confirmou o status taxonômico. As sequências utilizadas mostraram altos índices de similaridade genética com aquelas de *H. malabaricus* depositadas nessa plataforma, variando de 99,50 a 100%, portanto, dentro do limiar de até 3% proposto por Hebert et al. (2003) exigido para a identificação molecular em se tratando de uma mesma espécie. Esses resultados reforçam ainda mais a problemática taxonômica existente no grupo em questão, pois conforme constatado pela identificação molecular, trata-se de apenas um táxon sob a denominação de *H. malabaricus*, porém o referido táxon apresenta uma grande variabilidade genética entre as populações, sendo estes valores tão elevados que só são vistos em comparações de espécies diferentes.

A eficácia do código de barras de DNA para a avaliação da biodiversidade e para resolução de problemas taxonômicos, tal como a identificação das espécies, tem gerado grandes discussões, embora essa abordagem tenha provado ser bem sucedida para delimitar espécies num grande número de táxons (HEBERT et al., 2004; CLARE et al., 2006; WARD et al., 2009). Os resultados do presente estudo indicam que os níveis de divergência genética nos espécimes de *H. malabaricus* podem não ser restritos a populações de bacias hidrográficas diferentes, mas podem ocorrer mesmo entre os indivíduos em simpatria, conforme foi demonstrado em nosso estudo, com as populações dos rios Itapecuru, Mearim, Pindaré e Parnaíba apresentando pelo menos duas linhagens em todos os marcadores analisados, o que reforça a possibilidade de um complexo de espécies sem modificações abruptas na morfologia (espécies crípticas).

Abreu-Souza (2014), estudando populações de *H. malabaricus* das bacias hidrográficas maranhenses por meio da análise morfométrica percebeu uma discreta variação nestes espécimes, associados, principalmente, aos padrões de diferenças de

tamanho na região da cabeça e encurtamento/alongamento da região caudal. Esses resultados, aliados aos nossos resultados genéticos indicam uma possível especiação críptica e um processo de estruturação populacional nas espécies de *H. malabaricus* das bacias hidrográficas maranhenses.

Marques et al. (2013), estudando populações de um único citótipo de *H. malabaricus* da bacia Amazônica com o gene COI, encontraram valores de divergência elevados, indicando que existe uma variação genética mesmo dentro de um único cariomorfo. Para o Maranhão, segundo a literatura, as populações de *H. malabaricus* são representadas por um único citótipo. Assim como no estudo de Marques et al. (2013), os nossos resultados mostraram elevados valores de diferenciação genética, dentro de um único citótipo ocorrente no Maranhão.

5.2. Diversidade Genética

Os resultados da análise das populações agrupadas de *H. malabaricus* com base nos fragmentos gênicos analisados mostrou alta diversidade haplotípica para os espécimes maranhenses. Estes resultados são similares aqueles encontrados por Maria (2007), estudando traíras de bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul e bacias vizinhas, utilizando marcadores genéticos do tipo RAPD e o gene mitocondrial ATPase 6-8, que mostraram um processo de diferenciação entre os espécimes. Gravilets e Hastings (1996), afirmam que as populações podem acumular diferenças genéticas num período de tempo relativamente curto (algumas gerações). Esse padrão foi evidenciado no presente estudo, onde os resultados demonstraram a ocorrência de variação genética dentro dos espécimes analisados e indica um processo de diferenciação (SUZUKI et al., 2005).

Segundo Piorski (2010), no rio Pindaré, as diferenciações genéticas observadas, podem ser resultantes das características geográficas do rio associada às condições ecológicas de *H. malabaricus*, considerando-se que neste rio é comum a formação de lagoas marginais durante o período chuvoso, quando retém água e tornam-se isoladas do canal principal durante o período de estiagem, sendo então propício a manutenção da variabilidade genética observada na população. Além disso, por ser uma espécie sedentária e viver preferencialmente em populações isoladas, têm maior capacidade de registrar em seu DNA os eventos vicariantes ou ecológicos aos quais é submetida, pois a sua condição sedentária limita a sua capacidade em superar as barreiras físicas, ou

fugir de pressões ambientais impostas (ALEXANDER et al., 2006; LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013; MEYER; KNOWLES; VERHEYEN, 1996). Sendo assim, devido à condição sedentária na espécie, a possível estruturação, adaptação local e posterior especiação se dão em níveis mais elevados (BEHEREGARAY et al., 2015).

Abreu-Souza (2014), analisando um fragmento do íntron do gene nuclear *S7int1* em 24 espécimes de *H. malabaricus* de drenagens maranhenses, obteve também valores elevados de diversidade haplotípica ($h = 0,933$) e nucleotídica ($\pi = 0,013$). Esses resultados também confirmam o padrão de diversidade existente no táxon. Estudo de Pereira et al. (2013), analisando populações de *H. malabaricus* oriundas de bacias da região do leste do Brasil, utilizando os marcadores ATPase-6 e o gene nuclear ativador de recombinação (RAG2), encontrou alta divergência molecular (8,7 e 11,1%, respectivamente), para os espécimes estudados e distribuídos em quatro haplogrupos (Nordeste, Leste A, Leste B e Sudeste).

Altas taxas de divergência intraespecífica podem derivar de populações geograficamente isoladas (HEBERT et al., 2003); entretanto, nossos resultados demonstraram que mesmo dentro de uma única bacia pode haver uma elevada diferenciação, uma vez que diferentes linhagens podem estar presentes dentro de uma única bacia. Santos et al. (2009), estudando populações de *H. malabaricus* de doze bacias do sudeste e do nordeste do Brasil (próximas aos divisores de águas) também observaram alta divergência genética nos espécimes estudados. Estudos com populações em estágios intermediários de divergências permitem o aumento do entendimento de padrões de especiação e delimitação das espécies (OMLAND et al., 2006).

Segundo Lundberg et al. (1998) o padrão de divergência pode ser explicado levando-se em consideração a história geomorfológica das bacias hidrográficas a qual habitam. A ocorrência de espécies relacionadas nas bacias brasileiras tem sido atribuída aos efeitos das variações do nível do mar provocadas por ciclos de glaciação (WEITZMAN et al., 1988). Durante a máxima glacial, a diminuição nos níveis do mar podem ter favorecido a confluência dos rios adjacentes e permitido que os peixes de água doce tenham se dispersado entre as bacias (WEITZMAN et al., 1988; BEHEREGARAY et al., 2002). Além disso, captura de cabeceiras entre bacias (SAADI, 1995) pode explicar similaridades de fauna. Tais fatores podem ser considerados para tentar entender a distribuição dos espécimes entre as bacias analisadas, uma vez que os resultados das redes de haplótipos mostram separação incompleta das linhagens.

A variabilidade genética é um componente decisivo para a sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo, uma vez que é devido a ela que uma espécie está apta a se adaptar as constantes modificações do meio ambiente (FRANKHAM et al., 2002). É a variabilidade genética que permite que populações submetidas a mudanças ambientais respondam às pressões ecológicas no sentido contrário à redução populacional e à extinção local (WANG et al., 2002). Índices de variabilidade genética populacionais são bons indicadores de uma espécie, quanto mais elevados forem esses índices, maiores as chances dessas populações estarem em processo de diferenciação (SEQUEIRA et al., 2005), sendo, portanto, fundamental nos programas de manejo e conservação, pois é extremamente necessário a definição do status taxonômico.

Os resultados obtidos para o rio Turiaçu mostraram baixa diversidade genética para todos os marcadores mitocondriais analisados no estudo. Uma possível explicação para estes resultados é que durante o início do Mioceno o nível do mar estava em cerca de 40-50m acima do nível atual (FERREIRA et al., 1984). Nestas condições a drenagem do rio Turiaçu estaria inundada pelas águas do mar o que fez com que todas as espécies que habitavam o rio desaparecessem em contato com a água do mar. Quando as águas do mar regrediram, após um período de tempo, as espécies voltaram ao seu hábitat natural, porém demorando mais para se restabelecer. Portanto, esse evento ajuda a explicar a menor divergência genética encontrada para as espécies deste rio.

A alta variabilidade em nosso estudo por meio dos marcadores mitocondriais (COI, rRNA 16S e Cyt *b*) e pelo íntron do gene nuclear (TROP) aparenta ser uma característica comum da espécie, já que elevados índices de diferenciação foram retratados por outros autores utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares, como nos estudos de Dergam et al. (2002), Peres et al. (2002), Marques et al. (2013), Rosso et al. (2012), Santos (2009), Abreu-Souza (2014) e Pereira et al. (2013).

5.3. Relações Filogenéticas

A reconstrução filogenética obtida para os diferentes genes analisados mostrou a formação de pelo menos cinco haplogrupos entre os espécimes maranhenses, indicando a ocorrência de diferentes linhagens para estes rios. Abreu-Souza (2014), estudando *H. malabaricus* de drenagens maranhenses (Turiaçu, Pindaré, Mearim, Itapecuru, Munim, Gurupi, Parnaíba e Tocantins) através da região *D-loop*, encontrou oito haplogrupos: A - Pindaré + Mearim, B - Turiaçu, C - Gurupi, D - Itapecuru +

Médio Parnaíba, E – Munim, F – Baixo Parnaíba, G – Médio Parnaíba e H – Tocantins. É importante mencionar o padrão obtido para os espécimes do rio Amazonas, que formaram pelo menos três haplogrupos em todas as análises realizadas com os diferentes marcadores genéticos, sendo um deles mais diferenciados dos demais. Marques et al. (2013) estudando populações de *H. malabaricus* da bacia Amazônica, por meio do gene COI, encontrou a formação de seis haplogrupos, reforçando o padrão de diferenciação para o táxon.

Posada; Crandall (2001) sugerem que é provável que as árvores filogenéticas não sejam ideais para a identificação dos grupos intraespecíficos e podem causar baixa resolução filogenética, sendo as redes de haplótipos mais aplicáveis a essa problemática. Entretanto, em nosso estudo as redes de haplótipos corroboraram os resultados encontrados nas árvores filogenéticas, separando os espécimes em haplogrupos segundo o padrão observado nas análises anteriores, com a reunião dos espécimes em pelo menos cinco haplogrupos maranhenses principais, apoiando a hipótese de Separação Incompleta das Linhagens, devido ao compartilhamento dos haplótipos entre as bacias, sendo este padrão condizente com uma recente separação na escala de tempo evolutivo.

A concatenação dos genes é uma opção para evitar a perda de dados e combinar a história evolutiva dos genes para se aproximar da realidade evolutiva do grupo estudado. Os genes individuais são susceptíveis a variar por causa das diferentes taxas de substituição e as árvores resultantes de diferentes genes resultam em uma variabilidade de topologias. Uma quantidade reduzida de genes pode ser usada para reproduzir resultados mitogenômicos e melhorar as análises de grandes conjuntos de dados ou de sequências mitogenômicas incompletas (DUCHÊNE et al., 2011). A árvore concatenada revelou praticamente a mesma hierarquia mostrada pelas árvores individualizadas. Deve-se destacar a clara diferenciação dos espécimes amostrados no presente estudo, com a presença de diferentes linhagens, mesmo dentro de uma única bacia estudada. Como a espécie em questão apresenta uma grande variabilidade genética, os dados obtidos reforçam ainda mais a problemática taxonômica discutida na literatura para este complexo de espécies, reforçando a necessidade de uma revisão taxonômica do grupo.

Quanto mais recente for a separação das populações ou espécies, maiores as chances de haver compartilhamento de haplótipos, fenômeno caracterizado como Separação Incompleta de Linhagens (TAKAHASHI et al., 2001). Desta forma, o período de tempo que separa as diferentes linhagens pode não ser suficiente para torna-

las geneticamente distintas (SITES; MARSHALL, 2004). O padrão de distribuição e compartilhamento dos haplótipos encontrados nas árvores obtidas condiz com a teoria de Separação Incompleta das Linhagens, pois em espécies que divergiram recentemente, a bifurcação das árvores gênicas acontece antes do evento de separação das espécies, podendo confundir inferências filogenéticas e estudos populacionais, dificultando o processo de identificação de táxons válidos (TAKAHASHI et al., 2001). Aliado a isso, considera-se os padrões ecológicos da espécie, uma vez que se trata de uma espécie sedentária, a capacidade de registrar em seu DNA os eventos vicariantes ou ecológicos aos quais é submetida é maior, favorecendo assim o aumento da diversidade genética dentro das populações nas diferentes bacias hidrográficas (SABINO; ZUANON, 1998).

Roy et al. (2004) observaram que podem ocorrer variações intraespecíficas dentro de uma mesma bacia hidrográfica e similaridades intraespecíficas entre bacias distintas, o que foi evidenciado neste estudo, uma vez que houve compartilhamento de haplótipos entre bacias distanciadas geograficamente (Itapecuru, Turiaçu, Parnaíba). Atualmente, as bacias dos rios maranhenses estão isoladas umas das outras, exceto Mearim e Pindaré que constituem um sistema hidrográfico, porém há evidências que apontam a ocorrência de troca faunística também entre os rios Mearim-Itapecuru através da foz de seus rios (PIORSKI, 2010). Estes dados foram corroborados por nosso estudo que mostrou a formação de haplogrupos dos rios Parnaíba + Itapecuru + Mearim + Pindaré; Mearim + Itapecuru + Parnaíba, seguindo o padrão proposto na literatura.

Para Hubert; Renno (2006), assim como Lundberg (1998), a riqueza, o compartilhamento e a distribuição passada e presente de peixes continentais é complexa e pode ser explicada por meio de várias hipóteses, entre as quais eventos de “captura” de cabeceira de rios (conexões entre nascentes). Lundberg et al. (1998) sugeriram que a captura de cabeceira é um fenômeno usual, o qual há mais de 40 milhões de anos foi responsável pela origem de grande parte da diversidade de peixes continentais a partir de mudanças paleo-hidrológicas que permitiram a dispersão de faunas ancestrais e a posterior divergência alopátrica. Levando-se em conta os resultados obtidos em nosso estudo, essa hipótese pode explicar o porquê de rios isolados geograficamente terem compartilhado haplótipos, bem como explicar o padrão elevado de diversificação encontrado.

5.4. Estrutura Populacional

Segundo Avise (2004), a variação genética populacional deve ser função tanto da diversidade genética disponível originalmente para a espécie, quanto de processos contemporâneos como seleção, fluxo gênico, sistema de cruzamento entre outros, que governam como aquela variação é posteriormente repassada entre e dentro das populações. No caso dos peixes de água doce, suas populações em geral se distribuem por locais isolados, o que pode minimizar as trocas gênicas entre elas, levando a processos de diferenciação genética (RAMOS, 2007). Como as bacias hidrográficas maranhenses encontram-se na sua maioria sem conexão uma com as outras, os elevados valores de divergência observados em nosso estudo podem ser em função desse isolamento geográfico.

A AMOVA revelou que há uma estruturação genética para estas populações, a qual é apoiada significativamente pelo índice de fixação (F_{st}). De acordo com Wright (1965), valores entre 0 e 0,05 indicam baixo nível de diferenciação genética; valores entre 0,05 e 0,25 indicam diferenciação genética moderada; e acima de 0,25 indicam elevada diferenciação. Nossos resultados permitiram verificar que as populações analisadas apresentam valores de F_{st} de moderados (0,251) a elevados (0,640), portanto mais um indicativo de que os espécimes das bacias analisadas fazem parte de populações com estruturação genética, considerando-se os parâmetros adotados por Wright.

Segundo Hilsdorf et al. (2006), a avaliação genética de uma população distribuída em diferentes rios indica a intensidade com que o fluxo gênico ocorre entre as populações. Para Sirol e Britto (2006), a diminuição da variabilidade genética reduz a capacidade que os peixes possuem de se adaptarem a diferentes condições ambientais, sendo por isso um fator de preocupação, uma vez que leva a perda da biodiversidade. A união dos fatores que influenciam a diversidade e diferenciação genética entre as populações, juntamente com a estimativa da diversidade genética, e a distribuição intra e interpopulacional, é fundamental para traçar medidas de conservação de espécies, especialmente em táxons em que a taxonomia seja confusa, como em *H. malabaricus*.

O uso combinado de marcadores moleculares mostrou-se adequado e satisfatório para investigação da diversidade genética do complexo de espécies *H. malabaricus* nas bacias maranhenses. Os resultados descrevem o padrão de distribuição e diferenciação das populações estudadas, confirmando a problemática taxonômica existente para o

grupo. Esses dados foram reforçados pelos resultados populacionais obtidos para todos os marcadores, que mostraram um processo de diferenciação genética em curso, apoiado pelos valores de *Fst*. Além disso, comparações adicionais com populações de outras bacias hidrográficas foram importantes para se compreender melhor a história evolutiva e padrões biogeográficos deste complexo de espécies nas bacias maranhenses.

Estudos dessa natureza são necessários, uma vez que nem sempre as mudanças ocorridas em nível molecular em uma espécie, aparecem na morfologia, o que torna fundamental a associação de estudos genéticos, citogenéticos, morfológicos e ecológicos. Os dados de diversidade e estruturação genética encontrados na presente análise em populações de *H. malabaricus* nas bacias hidrográficas maranhenses por meio dos genes COI, rRNA 16S, Cyt *b* e alfa-tropomiosina nos fornecem informações importantes quanto à diferenciação genética em populações desta espécie e evidenciam a ocorrência de diferentes linhagens nas bacias estudadas. Os resultados obtidos são um indicativo de que mesmo dentro de um único citótipo, como é relatado na literatura para os rios maranhenses (citótipo F), há uma grande variação genética nos espécimes, reforçando a problemática taxonômica existente em *H. malabaricus*.

Os resultados obtidos indicam claramente a necessidade de uma revisão taxonômica para *H. malabaricus*, pois há uma grande variação genética entre os espécimes maranhenses estudados, bem como um processo de estruturação genética em curso, apoiado pelos valores de *Fst* encontrados. A análise dos dados permite inferir que trata-se na verdade de um complexo de espécies crípticas, englobadas sob uma mesma denominação. Recomenda-se, portanto, que seja feito um estudo citogenético, aliado aos dados moleculares e taxonômicos existentes na literatura na tentativa de elucidar as questões pertinentes a este táxon.

6. CONCLUSÃO

- ✓ A identificação molecular obtida com o gene COI confirmou o *status* taxonômico de *H. malabaricus* para os rios maranhenses com altos índices de similaridades;
- ✓ As populações estudadas apresentaram elevados níveis de variabilidade genética, com os diferentes marcadores mitocondriais (rRNA 16S, COI e Cyt *b*) e nuclear (alfa-tropomiosina);
- ✓ A AMOVA confirmou a estruturação genética nas populações maranhenses com valores de *Fst* que variaram de moderado/alto com *p* altamente significativo, para todos os marcadores moleculares analisados;
- ✓ A existência de pelo menos cinco linhagens diferenciadas para as populações maranhenses foi revelada a partir das diferentes regiões genômicas analisadas;
- ✓ Capturas de cabeceiras e eventos tectônicos, associados ao sedentarismo de *H. malabaricus* parecem ter sido fatores cruciais para o padrão de divergência genética encontrado na espécie;
- ✓ As diferenciações genéticas ocorreram até mesmo dentro de uma única bacia hidrográfica, indicando a necessidade de conservação de cada uma dessas bacias como modo de não perder parte da diversidade genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU – SOUZA, C. P. **Diversidade e morfométricas de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) em drenagens do estado do Maranhão.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão – UFMA, São Luís. 2014.
- ALEXANDER, H. J.; TAYLOR, J. S.; WU, S. S. T.; BREDEN, F. Parallel evolution and vicariance in the guppy (*Poecilia reticulata*) over multiple spatial and temporal scales. **Evolution**, v. 60, n. 11, p. 2352-2369. 2006.
- ANISIMOVA, M; GIL, M; DUFAYARD, J. F; DESSIMOZ, C; GASCUEL, O. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. **Systematic Biology**, v. 60, p. 685–699. 2011.
- AVELINO, G. S.; BRITSKI, H. A.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Molecular identification of *Leporinus* from the south portion of South America. **DNA Barcodes**, v. 3, p. 98 – 109. 2015.
- AVISE, J. C. Ten Unorthodox Perspectives on Evolution Prompted by Comparative Population Genetic Findings on Mitochondrial DNA. **Annual Review of Genetics**, v. 25, p. 45-69. 1991.
- AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. **Sinauer Associates**. 2004.
- BARROS, L.A.; MORAES FILHO, J.; OLIVEIRA, R.L. Larvas de nematóides de importância zoonótica encontradas em traíras (*Hoplias malabaricus* Bloch, 1794) no município de Santo Antônio do Leverger, MT. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte MG, v.59, n.2, p.533-535, 2007.
- BECKER, S.; HANNER, R.; STEINKE, D. Five years of FISH-BOL: brief status report. **Mitochondrial DNA**, v. 22 Suppl 1, p. 3-9, 2011.
- BEHEREGARAY, L.B., SUNNUCKS, P., BRISCOE, D.A. A rapid fish radiation associated with the last sea level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 269, p. 65-73. 2002.
- BEHEREGARAY, L. B.; COOKE, G. M.; CHAO, N. L.; LANDGUTH, E. L. Ecological speciation in the tropics: insights from comparative genetic studies in Amazônia. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. January, p. 1-19, 21 jan. 2015.
- BENITES, C. **Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia hidrográfica Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares tipo microssatélite.** 88f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal. 2008.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, n. 1, v. 2, p.103-120. 1978.

BERTOLLO, L. A. C., M. S. FONTES, A. S. FENOCCHIO & J. CANO. The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. **Chromosome Research**, v. 5, p. 493-499. 1997.

BERTOLLO, L.A.C.; BORN, G.G.; DERGAM, J.A.; FENOCHIO, A.S.; MOREIRA-FILHO, O. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomy considerations. **Chromosome Research**, v. 8, p. 603-613. 2000.

BIFI, A.G. **Revisão taxonômica das espécies do grupo *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes: Erythrinidae) da bacia do rio da Prata**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. 2013.

BLANCO, D. R., L. R. LUI, L. A. C. BERTOLLO, D. DINIZ; FILHO, O. M.. Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in FishBiology and Fisheries**. 2010.

BLAXTER, M. L. The promise of DNA taxonomy. **Philosophical Transactions of Royal Society B**, v. 359, p. 669-679. 2004.

BLOCH, M. E. Naturgeschichte der ausländischen Fische, vol. 8. Berlin. iv + 174 p., pls. 361-396. 1794.

BLOCH, M. E.; SCHNEIDER, J. G. M. E. Blochii, Systema Ichthyologiae iconibus ex illustratum. Post obitum auctoris opus inchoatum absolvit, correxit, interpolavit Jo. Gottlob Schneider, Saxo. Berolini. **Sumtibus Auctoris Impressum et Bibliopolio Sanderiano Commissum**. lx + 584 p., pls. 1-110. 1801.

BRASIL. MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES. Informativo Rio Mearim. **Companhia das Docas do Estado do Maranhão- CODOMAR**. São Luís. 2006.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z. DE S.; LOPES, B.S. Peixes do Pantanal: Manual de identificação. **Embrapa**. Brasília – DF. 1999.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; DeSALLE, R. Relationships among Characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p.135-153, 2005.

CIBOIS, A., PASQUET, E., SCHULENBERG, T. S. Molecular systematics of the *Malagasy babblers* (Timaliidae) and Warblers (Sylviidae), based on cytochrome b and 16S rRNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 3, p. 581-595. 1999.

CIOFFI, M. B., MARTINS, C; BERTOLLO, L. A. C. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BioMed Central Genetics**, v.10, n. 34. 2009.

CLARE, E. L.; LIM, B. K M.; ENGSTROM, D. J.; EGER, L.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes**, n.7, p.184-190.2006.

CODEVASF. 2010. **Companhia de Desenvolvimento do vale do São Francisco**.

DERGAM J. A., PAIVA, S. R., SHAEFFER, C. E., GODINHO, A. L., VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**; v.25, n.4; p.379-387. 2002.

DUCHENE, S., ARCHER, F. I., VILSTRUP, J., CABALLERO, S., MORIN, P. A. Mitogenome phylogenetics: The impact of using single regions and partitioning schemes on topology, substitution rate and divergence time estimation. **PLoS ONE**, v. 6, e27138. 2011.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 214-221. 2007.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin: a software for population data analysis. Version 3.1. Geneva: **University of Geneva**. 2007.

FARIAS, I. P.; ORTÍ, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; MEYER, A. Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of Neotropical Assemblage. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, p. 703-711. 2001.

FERREIRA, C.S.; VICALVI, M.A.; MACEDO, A.C.M. Limites meridionais da Bacia de Pirabas, estado do Pará. **XXXIII Congresso Brasileiro de Geologia (Rio de Janeiro)**, v.1, p.326-329. 1984.

FRAGA, E.; SCHNEIDER, H.; NIRCHIO, M.; SANTA-BRIGIDA, E.; RODRIGUES-FILHO, L. F.; SAMPAIO, I. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. **Journal of Applied Ichthyology**, v.23, p. 598-604. 2007.

FRAGA, E.; SILVA, L.M.M.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; BARROS, M.C. Variabilidade genética em populações naturais de *Leporinus piau* (Anostomidae, Characiformes) da bacia do Rio Itapecuru. **Revista Trópica**, v.8, n. 2, p.28-40. 2014.

FRANKHAM, R., BALLOU, J.R.; BRSCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press. Cambridge, England 640pp. 2002.

FRIESEN, V. L., CONGDON, B. C., KIDD, M. G., BIRT, T. P. Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five nuclear introns in vertebrates. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 2141-2152. 1999.

GALLETTI, E. S. **Distribuição da variabilidade genética da pescada, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) na calha do rio Amazonas. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus. 67pp. 2009.**

GILL, T. N. Synopsis of the fresh water fishes of the western portion of the island of Trinidad, W. I. **Annals of the Lyceum of Natural History of New York** v. 6, n. 10-13, p.363-430. 1858.

GILL, T. N. A new name (*Hoplias*) for the genus Macrodon of Müller. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 16, p. 49-52. 1903.

GUINDON, S., DUFAYARD, J. F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W., GASCUEL, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p.307-21. 2010.

GRAVILETS, S.; HASTINGS, A. Founder effect speciation: a theoretical assesment. *The American Naturalist*. v. 147, p. 466-491.1996.

GÜNTHER, A. **Catalogue of the fishes in the British Museum**. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiatidae in the collection of the British Museum. v. 5: i-xxii + 1-455. 1864.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium**. Serie A. v. 41, p. 95-98. 1999.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A; BALL, S. L. e WARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 270, p. 313-321. 2003.

HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN D.H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA batcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **PNAS**, v.101, n.41, p.14812-14817, 2004.

HILSDORF, A. W. W.; RESENDE, E. K.; MARQUES, D. K. S. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação atual e perspectivas. Documentos/ Embrapa Pantanal, Corumbá. 43f. 2006.

HUBERT, N.; RENNO, J. F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, 1414-1436. 2006.

IBGE. **Zoneamento Geoambiental do Estado do Maranhão – diretrizes gerais para a ocupação territorial**. Salvador. 1997.

IBGE. **Censo Demográfico do Brasil, 2000**. Rio de Janeiro, 2002. v. 2.

JACOBINA, U. P., P. R. A. M. AFFONSO, P. L. S. CARNEIRO & J. A. DERGAM. Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p.617-622. 2009.

KEANE, T. M.; CREEVEY, C. J.; PENTONY, M. M.; NAUGHTON, T. J.; MCINERNEY, J. O. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, p. 29. 2006.

KIDD, D. M.; RITCHIE, M. G. Phylogeographic information systems: Putting the geography into phylogeography. **Journal of Biogeography**, v. 33, p. 1851-1865. 2006.

- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120. 1980.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSPv5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452. 2009.
- LÓPEZ – FERNÁNDEZ, H.; ARBOUR, J. H.; WINEMILLER, K. O; HONEYCUTT R. L. Testing for ancient adaptive radiations in Neotropical cichlid fishes. **Evolution**, v. 67, p. 1321– 1337. 2013.
- LOVEJOY, N. R.; DE ARAÚJO, L.G. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 259-268. 2000.
- LUNDBERG, J. G. The temporal context for diversification of Neo-tropical fishes. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena CAS, Lucena ZMS (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, pp. 67–91. 1998.
- LUNDBERG, J. G; MARSHALL, L. G.; HORTON, B.; MALABARBA, M. C. S. L.; WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS. p 13–48. 1998.
- MADDISON, W. P.; MADDISON, D.R. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis**. Versin 2.75. Available from <<http://mesquiteproject.org>>. 2011.
- MARIA, L. **Diversidade genética de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi, Characiformes, Erythrinidae) no Rio Grande do Sul**. 2007. 87f. Tese (Doutorado em Zoologia)- Faculdade de Biociências, PUC-RS, Porto Alegre- RS, 2007.
- MARQUES, D. K. S.; GURGEL, H. C. B.; LUCENA, I. Época de reprodução de *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 3, p. 61-67. 2001.
- MARQUES, D. F., F. A. SANTOS, S. S. SILVA, I. SAMPAIO & L. R. R. RODRIGUES. 2013. Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n.2, p. 459-466. 2013.
- MEYER, A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. **Trend Ecology and Evolution**, v. 9, n. 8, p. 278–280. 1994.
- MORELLI, S.; VICARI, M. R. & BERTOLLO, L. A. C. Evolutionary cytogenetics of the *Hoplias lacerdae*, Miranda Ribeiro, 1908 group: a particular pathway concerning the other Erythrinidae fish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67. 2007.
- OMLAND, K. E., BAKER, J. M., PETERS, J. L. Genetic signatures of intermediate divergence: population history of old and new world holarctic ravens (*Corvus corax*). **Molecular Ecology**, v. 15, p. 795-808. 2006.

ORSI, M. L., CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 2, p. 207-218. 2004.

OYAKAWA, O. T. **Relações Filogenéticas das Famílias Pyrrhulididae, Lebiassinidae e Erythrinidae (Osteichthyes, Characiformes) [tese]**. São Paulo (SP): Dept. Zoologia, Instituto de Biociências, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 1998.

OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae (Trahiras). Pp. 238- 240. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferrari Jr. (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, 729p. 2003.

OYAKAWA, O. T.; MATTOX, G. M. T. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. **Neotropical Ichthyology**, v.7, p. 117-140. 2009.

PALUMBI, S. **The simple fool's guide to PCR, version 2.0**. University of Hawaii, Honolulu. 1991.

PALUMBI, S.R. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D., Moritz, C., Mable, B. (Eds.), **Molecular Systematics**. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA. 1996.

PAZZA, R.; JULIO JR, H. F. Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in Upper Paraná River floodplain (Brazil). **Cytologia**, v 68, p.159-163. 2003.

PEREIRA, T. L., SANTOS, U.; SCHAEFER, C. E.; SOUZA, G. O.; PAIVA, S. R.; MALABARBA, L. R.; SCHMIDT, E. E.; DERGAM, J. A. Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. **Journal of Biogeography**, 2012: 1-10. 2012.

PEREIRA, T. L., SANTOS, U.; SCHAEFER, C. E.; SOUZA, G. O.; PAIVA, S. R.; MALABARBA, L. R.; SCHMIDT, E. E.; DERGAM, J. A. Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. **Journal of Biogeography**, v. 40, 905–914. 2013.

PERES, M., RENESTO, E., LAPENTA, A. S., ZAWADZKI, C. H. Genetic Variability in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes: Erythrinidae) in Fluvial and Lacustrine Environments in the Upper Paraná River Floodplain (Paraná State, Brazil). **Biochemical Genetics**, v. 40, n. 7/8, p. 209- 223. 2002.

PIORSKI, N. M.; CASTRO A. C. L.; SOUSA NETO, A. M. DE S. Peixes do cerrado da Região sul Maranhense. In: Barreto, L. et al, **Cerrado do Norte do Brasil**. North cerrado of Brasil. Pelotas: Ed. USEB., 378 f. 2007.

PIORSKI, N. M. **Diversidade Genética e Filogeográfica das Espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil**. 2010. 152f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução)- Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Paulo. 2010.

- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. A intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, p. 37-45. 2001.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. Tracer v 1.5.0. 2009. <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.
- RAMOS, J. V. B. **Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no complexo Canoas – rio Paranapanema**. 2007. 85f. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.
- RATNASINGHAM, S.; P.D.N. HEBERT. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p.355-364, 2007.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572–1574. 2003.
- ROSA, R., M.; CAETANO-FILHO, O.; SHIBATTA, A.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytotaxonomy in distinct populations of *Hoplias* aff. *malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) from lower Paranapanema River basin. **Journal of Fish Biology**, v. 75: p. 2682- 2694. 2009.
- ROSSO, J. J.; MABRAGAÑA, E.; GONZÁLEZ CASTRO, M.; DÍAZ DE ASTARLOA, M. DNA barcoding Neotropical fishes: recente advances from the Pampa Plain, Argentina. **Molecular Ecology Resources**, v.12, p. 999-1011. 2012.
- ROY, D.; DOCKER, M. F.; HEHANUSSA, P.; HEATH, D. D.; HAFFNER, G. D. Genetic and morphological data supporting the hypothesis of adaptive radiation in the endemic fish of Lake Matano. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, p.1268-1276. 2004.
- SAADI, A. A geomorfologia da Serra do Espinhaço em Minas Gerais e suas margens. **Geonomos**, v. 3, p. 41-63. 1995.
- SABINO, J.; ZUANON, J. A stream fish assemblage in central Amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 8, p. 201-210. 1998.
- SALZBURGER, W., EWING, G.B.; VON HAESELER, A. **The performance of phylogenetic**. 2011.
- SANGER, F., S. NICKLEN; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p. 5463-5467. 1977.
- SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 151-161. 2003.
- SANTOS, G. M., FERREIRA, E. J. G.; J. ZUANON, A. S. Peixes comerciais de Manaus. 2ª edição. INPA , Manaus 141 p. 2006.

SANTOS, U., VÖLCKER, C.M., BELEI, F.A., CIOFFI, M.B., BERTOLLO, L.A.C., PAIVA, S.R.; DERGAM, J.A. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 2326-2343. 2009.

SCALLY L., HODKINSON T. R., JONES M. B. Origins and taxonomy of miscanthus. In: **Miscanthus for Energy and Fibre** (eds M.B. Jones & M. Walsh). James & James, London. 2001.

SEQUEIRA, F., ALEXANDRINO, J., ROCHA, R., ARNTZEN, J. W., FERRAND, N. Genetic exchange across a hybrid zone within the Iberian endemic golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 245-254. 2005.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651-701. 1994.

SIROL, R. N.; BRITTO, S. G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M. G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Ed.). **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas**. São Carlos: RiMA, p. 275- 284. 2006.

SITES JR., J. W., MARSHALL, J. C. Operational criteria for delimiting species. Annual Review of Ecology, **Evolution and Systematics**, v. 35, p.199-277. 2004.

SMITH, M. F.; PATTON, J. L. The diversification of South American murid rodents: Evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. **Biology Journal Linnean Society**, v. 50, p.149-177. 1993.

SPIX, J. B. von; AGASSIZ, L. Selecta genera et species piscium quos in itinere per Brasiliam annos MDCCCXVII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I... colleget et pingendso curavit Dr J. B. de Spix. Monachii. Part 1: i-xvi + i-ii + 1-82, Pls.1-48. 1829.

SOARES, E. C. **Peixes do Mearim**. São Luís/MA. Instituto Geia. 2005.

SUDENE. **Projeto Itapecuru**. Recursos Pesqueiros. Recife, PE, 1977.

SUZUKI, H. I.; BULLA, C. K.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. Estratégias reprodutivas de assembleias de peixes em reservatórios. In: RODRIGUES, L.; THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. (Ed.). **Biocenoses em reservatórios: padrões espaciais e temporais**. São Carlos- SP: RIMA, p. 223-242. 2005.

TAKAHASHI, K., TERAJ, Y., NISHIDA, M., OKADA, N. Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in lake Tanganyika as revealed by analysis of the insertion of retroposons. **Molecular Biology and Evolution** v.18, n.11, p. 2057-2066. 2001.

TAMURA, K; STECHER, G; PETERSON, D; FILIPSKI, A; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.:30, p. 2725-2729. 2013.

- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, n. 22, p. 4673-4680. 1994.
- VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): a population analysis in adjacent hydrographics basins. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 103-110. 2005.
- WANG, J. T. L.; ZHANG, K; CHANG, G; SHASHA, D. Finding approximate patterns in undirected acyclic graphs. **Pattern Recognition**, v. 35, n.2, p. 473- 483. 2002.
- WARD R.D., ZEMLBAK T.S., INNES, B.H., LAST, P.R. & HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions of the Royal Society B**, v. 360, n. 1462, p. 1847 – 1857. 2005.
- WARD, R. D., HANNER, R. e HEBERT, P. D. N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 329-356. 2009.
- WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **Bioessays**, v. 29, n. 2, p. 188-97, 2007.
- WEITZMAN, S. H., MENEZES, N. A.; WEITZMAN, M. J. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. **Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns** (ed. por P.E. Vanzolini & W.R. Heyer), 379-427. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Brasil. 1988.
- WOESE, C.R., FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy USA**, v. 97, p. 8392–8396. 1977.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420. 1965.

ANEXO

Protocolo de extração de DNA kit PROMEGA

- Retirou-se um fragmento de 20mg tecido.
- Preparou-se solução composta de EDTA - 0,5M (60 µl) e Nuclei Lysis Solution (250 µl);
- Levou-se a solução ao freezer por 5 minutos (proporcional à quantidade dos reagentes), tomando-se o cuidado para não congelar;
- Para cada µl de cada amostra, usar 300 µl da solução preparada para cada um dos tubos;
- Colocou-se 15 µl de proteinase K e deixa-se a amostra em banho Maria a 65° C até degradar todo o tecido (mais ou menos três horas, dependendo do tipo de tecido);
- Adicionou-se 10 µl de RNase solution e levou-se os tubos à estufa a 37° C por 30 minutos;
- Após retirar as amostras da estufa adicionou-se 150 µl do reagente Protein Precipitation Solution;
- Agitou-se delicadamente os tubos;
- Agitou-se no vórtex para garantir a homogeneização dos reagentes;
- Colocou-se no freezer por cinco minutos;
- Centrifugou-se por 10 min. a 15.000 Rotações por minuto (RPM);
- Adicionou-se 600 µl de isopropanol (para precipitar o DNA) em um novo tubo.
- Retirou-se o sobrenadante do material centrifugado; colocando-o junto com isopropanol;
- Centrifugou-se novamente por 10 minutos a 15.000 rpm;
- Descartou-se o isopropanol e colocou-se o tubo sobre papel absorvente;
- Em seguida adicionou-se 500 µl de álcool 70% aos tubos e agitou-se gentilmente para visualizar-se o pellet de DNA;
- Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
- Descartou-se o álcool;
- Submeteu-se as amostras a um spin;
- Retirou-se o excesso de álcool com a pipeta vermelha, tomando cuidado para não remover o pellet;
- Colocou-se o tubo aberto na estufa por 10 minutos;

- Colocou-se 50 μ l de solução DNA rehydratation ou TE;
- Se o DNA fosse usado no mesmo dia colocaria na estufa por um mínimo de três horas; caso contrário deixaria em temperatura ambiente por no mínimo 12 horas;
- Depois do overnight colocou-se no freezer para posterior quantificação;
- O DNA foi quantificado através da visualização em gel de agarose a 1% em uma proporção de 3 μ l do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 5 μ l de DNA e também no quantificador L- Quant Loccus Biotecnologia.

Protocolo para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada em um volume final de 25 μ l, com os seguintes reagentes:

- 4 μ l de DNTPs (1,25 mM) (nucleotídeos);
- 2,5 μ l de solução tampão de 10X buffer (200mM Tris-HCl, pH 8.4 and 500mM KCl);
- 1 μ l de solução de $MgCl_2$ (50 mM);
- 1 μ l de DNA (250 ng/ μ l);
- 0,25 μ l de cada primer (200 ng/ μ l);
- 0,2 μ l da enzima Taq polimerase (5U/ μ l);
- Água purificada para completar o volume final da reação.

Para a amplificação dos fragmentos das três regiões do genoma mitocondrial (rRNA 16S, COI e Cyt *B*) e do gene do DNA nuclear (TROP), foram usados primers e condições específicas conforme descrito na Tabela 2.

Os produtos da PCR foram visualizados em minigel de agarose a 1% em uma proporção de 3 μ l do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 5 μ l de DNA e purificados com a enzima ExoSAP-IT conforme recomendações do fabricante.

Protocolo para Precipitação da reação de sequência

- Submeter a placa a um spin (centrífuga de placa);
- Adicionar 2,5 μ l de EDTA (125 mM);
- Vedar a placa e submeter a um spin;
- Adicionar 30 μ l de Etanol 100%;
- Vedar a placa e misturar invertendo 4-5x;

- Envolver a placa em papel alumínio e deixar em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4° C);
- Centrifugar a 4.000 rpm por 30 minutos;
- Inverter bruscamente a placa para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- Centrifugar a placa invertida por 1 minutos a 1.150 rpm;
- Adicionar 30µl de Etanol a 70%;
- Vedar a placa;
- Centrifugar a 3.440 rpm por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4° C);
- Inverter bruscamente para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- Centrifugar a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;
- Deixar a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool.