



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL - BIONORTE



DIVERSIDADE GENÉTICA DOS PEIXES SERRASALMÍDEOS
NA AMAZÔNIA

Valéria Nogueira Machado

Manaus-AM
2016

VALÉRIA NOGUEIRA MACHADO

DIVERSIDADE GENÉTICA DOS PEIXES SERRASALMÍDEOS
NA AMAZÔNIA

Orientador: Dr. Tomas Hrbek

Co-orientador: Dr. Rupert Collins

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Manaus-AM
2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M149d Machado, Valéria Nogueira
Diversidade genética dos peixes serrasalmídeos na Amazônia /
Valéria Nogueira Machado. 2016
99 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Tomas Hrbek
Coorientador: Rupert Alexander Collins
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Serrasalmídeos. 2. Diversidade críptica. 3. DNA barcode. 4.
Estrutura populacional. 5. DNA mitocondrial. I. Hrbek, Tomas II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

Sinopse:

Atualmente é reconhecida a monofilia da família Serrasalminidae, no entanto a parafilia de alguns gêneros ainda persiste. Essa família é composta de aproximadamente 90 espécies distribuídas em 17 gêneros. A diversidade desses peixes na América do Sul ainda é subestimada, muito em razão da grande variação ontogenética apresentada por alguns táxons desse grupo e também devido a ampla distribuição dessa família no continente Sul-Americano. Foram utilizados dois marcadores mitocondriais (COI e DLoop) para analisar a diversidade e aspectos populacionais dos peixes Serrasalmídeos nas bacias do Amazonas, Orinoco e São Francisco, além de inferir quais os mecanismos históricos e filogeográficos foram responsáveis pela diversificação dos pacus e piranhas na Amazônia.

Palavras-chave: Serrasalmídeos, Diversidade críptica, DNA barcode, estrutura populacional, DNA mitocondrial

*Dedico esse trabalho a todas as pessoas que amam,
respeitam e principalmente preservam esse patrimônio grandioso chamado
Amazônia.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela força pra seguir em frente.

Agradeço a Dra Izeni Pires Farias pela acolhida, incentivo, amizade e principalmente pela confiança.

Ao Dr Tomas Hrbek pela orientação.

Ao Dr. Rupert Collins pela ajuda em várias etapas do trabalho e, principalmente pela ajuda nas análises e incentivo para finalização do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Rede Bionorte.

A Universidade Federal do Amazonas na pessoa da professora Dra Izeni Pires Farias pela utilização do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL).

Ao Projeto Sisbiota na pessoa da Dra. Izeni Pires Farias pela concessão da bolsa.

Ao Projeto Pronex/Fapeam na pessoa da Dra. Izeni Pires Farias, que me permitiu coletar os peixes e principalmente conhecer a maravilhosa Amazônia, de Leste a Oeste e de Norte a Sul.

A todos os colegas de laboratório pela ajuda, incentivo e principalmente pelo bom ambiente de trabalho que sempre tivemos.

Queria agradecer especialmente as minhas super amigas Waleska Gravena, Aline Ximenes, Priscila Azarak, Juliana Vieira e Joiciane Farias por todos os momentos vividos nesses quase cinco anos de convivência no Legal.

Aos meus super amigos Mário Nunes, José Erickson, Emmanuel Ribeiro, Adriano Cantuária e Victor Fonseca pelas parcerias nas coletas, ajuda no laboratório, ajuda nas análises, momentos de descontração etc.

À querida amiga Rafaela Ota por toda ajuda na identificação dos Serrasalmídeos e tombamento dos exemplares na Coleção Ictiológica do Inpa.

À Dra. Lucia Py-Daniel pela parceria nas coletas em dois lugares maravilhosos dessa Amazônia: rio Pitinga e rio Xingu.

Ao querido amigo Romério Briglia (ICMBio Roraima) por me proporcionar uma das mais incríveis expedições de coleta: expedição Terra Incógnita ao rio Água Boa do Univini, um lugar simplesmente mágico.

Ao colega Marcelo Andrade (UFPA) pela ajuda na identificação dos peixes e pelas amostras de tecido de Tometes.

Agradeço aos amigos que fiz durante nossas coletas, são tantos: Silvio e Dalva Seixas de Nhamundá, Sr. Zé Maria e Sra Altina de Caracaraí, Sr. Raimundo de Pimental no rio Tapajós pela acolhida e ajuda nas coletas nessas localidades.

Ao meu pai Xavier e minha mãe Raimunda pela torcida e incentivo para a conclusão desse trabalho.

Aos meus irmãos Emerson, Zacarias e Xavier e as minhas irmãs Vandira, Viviane e Meirelane pelo apoio incondicional.

Quero agradecer de forma muito especial a minha querida orientadora, amiga, Dra Izeni Pires Farias, que sempre foi uma luz na minha vida. A senhora é o exemplo de profissional e de ser humano que eu quero seguir sempre. Trabalhar esses quase 10 anos com a senhora foi uma honra muito grande.

RESUMO

Serrasalminidae é uma família de peixes neotropicais com ocorrência natural exclusivamente no continente Sul-Americano. Esses peixes estão distribuídos nas principais bacias de drenagens desse continente, sendo abundantes no Amazonas e Orinoco, porém ocorrem também no sistema Paraná-Paraguai e na bacia do rio São Francisco. Habita uma grande variedade de corpos de água, incluindo o canal principal dos rios, os lagos, a floresta alagada até ambientes de corredeiras e cachoeiras nas cabeceiras dos rios. Muitas espécies de Serrasalmídeos, principalmente dos gêneros *Piaractus*, *Colossoma* e *Mylossoma* são economicamente importantes, representando uma importante fração da pesca comercial no Amazonas e também são utilizados na aquicultura. Outras espécies são importantes para o mercado de peixes ornamentais como as espécies do gênero *Metynnis*, e representantes dos gêneros *Mylesinus*, *Myleus* e *Tometes* estão entre as espécies de peixes mais importantes para alimentação nas comunidades indígenas amazônicas. Embora a monofilia desse grupo já seja definida, alguns gêneros de pacus como os gêneros *Tometes*, *Mylesinus*, *Myleus* e *Myloplus* e as espécies de piranha *Serrasalmus rhombeus* e *Pristobrycon striolatus* ainda permanecem problemáticas taxonomicamente. Em consequência da indefinição no posicionamento desses táxons, o estado atual da estrutura e variabilidade genética das populações de muitas espécies de Serrasalminidae não é conhecido. Nesse sentido nós utilizamos a metodologia do DNA barcode pra analisar a diversidade desses peixes na América do Sul e também foi realizada uma análise filogeográfica através do sequenciamento dos genes do DNA mitocondrial (região controle e o gene citocromo c oxidase (COI)), com o objetivo de avaliar a real diversidade de piranhas e pacus na Amazônia e também analisar comparativamente a distribuição de alguns táxons de Serrasalmídeos com ampla distribuição na Amazônia. Para a análise de diversidade foram usadas 1.036 sequências do gene COI de 68 espécies e morfotipos de Serrasalmídeos e para a análise filogeográfica foram usadas de forma concatenada, 71 sequências do gene COI e região controle de *S. rhombeus*, 35 de *Pygocentrus nattereri*, 26 de *Myloplus schomburgkii* e 26 de *Myleus setiger*. Os resultados indicam altos níveis de diversidade críptica dentro dos Serrasalmídeos. De 68 espécies morfológicas analisadas, foram identificadas molecularmente 82 espécies. O maior número de linhagens intraespecíficas foi observado dentro dos pacus dos gêneros *Myleus*, *Myloplus* e *Mylesinus* e das piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Essa grande divergência intraespecífica ocorre justamente nos gêneros com maiores incertezas taxonômicas e com mais ampla distribuição geográfica de suas espécies. Os resultados mostram ainda que *S. rhombeus*, *P. nattereri*, *M. schomburgkii* e *M. setiger* não se comportam como populações panmíticas dentro de suas áreas de ocorrência apresentando linhagens estruturadas com divergência datando do Plioceno. Eventos vicariantes nesse período parecem ser os responsáveis pela estrutura atual dessas linhagens na Amazônia.

Palavras-Chave: Serrasalminidae, diversidade genética, DNA barcoding, linhagens divergentes

ABSTRACT

Serrasalminae is a family of Neotropical fishes with exclusive natural occurrence in the South American continent. These fishes are distributed in the main drainage basins of the continent, being abundant in the Amazon and Orinoco, but also occurring in the Paraná-Paraguay system and São Francisco River Basin. It inhabits a wide variety of water bodies, including the main channel of the rivers, lakes, the flooded forest and rapids or waterfalls environments in the headwaters of rivers. Many species of Serrasalminae, mainly from the genera *Piaractus*, *Colossoma* and *Mylossoma*, are economically important, representing a significant proportion of commercial fishing in the Amazon and used in aquaculture. Other species are important for the ornamental fish market as the species of the genus *Metynnis*. Some representative species of *Mylesinus*, *Myleus* and *Tometes* genera are among the most important species of fish for feeding in Amazonian indigenous communities. While the monophyly of this group is already defined, some pacu genera as *Tometes*, *Mylesinus*, *Myleus* and *Myloplus*, and piranha species as *Serrasalmus rhombeus* and *Pristobrycon striolatus* remain problematic taxonomically. As a result of uncertainty in the positioning of these taxa, the current status of the structure and genetic variability of populations of many species of Serrasalminae is unknown yet. In order to contribute for resolve this problem, we use the DNA barcode methodology and performed a phylogeographic analysis by sequencing of the mitochondrial DNA genes [control region and cytochrome gene c oxidase (COI)] with the aim of evaluate the real diversity of piranhas and pacus in the Amazon; and also to perform a comparative analysis of some Serrasalminae taxa widely distributed in the Amazon. For diversity analysis were used 1,036 sequences of the COI gene from 68 species and morphotypes of Serrasalminae. For the phylogeographic analysis were used concatenated sequences of COI gene and control region from 74 individuals of *S. rhombeus*, 35 of *Pygocentrus nattereri*, 26 of *Myloplus schomburgkii* and 26 of *Myleus setiger*. The results indicate high levels cryptic diversity within Serrasalminae. From a total of 68 morphological species analyzed, 82 species were molecularly identified. The largest number of intraspecific lineages was observed within the pacu of the *Myleus*, *Myloplus* and *Mylesinus* genera; and within the piranhas of *Serrasalmus* and *Pygocentrus* genera. This wide intraspecific divergence occurs exactly in the genera with higher taxonomic uncertainties and wider distribution of its species. The results also show that *S. rhombeus*, *P. nattereri*, *M. schomburgkii* and *M. setiger* not behave like panmitic populations within their occurrence areas, showing structured lineages with divergence time dating from the Pliocene. Vicariant events during this period appear to be responsible for the current structure of these lineages in the Amazon.

Keywords: Serrasalminae, genetic diversity, DNA barcoding, divergent lineages

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Localidades amostradas na bacia do rio Orinoco, bacia Amazônica e bacia do rio São Francisco **18**

Capítulo II

Figura 1. Espécies de Serrasalmídeos utilizados na análise fitogeográfica para comparação dos padrões de diversificação nas bacias do Amazonas, Orinoco e Tocantins-Araguaia: (a) *Serrasalmus rhombeus*, (b) *Pygocentrus nattereri*, (c) *Myloplus schomburgkii* e (d) *Myleus setiger* **51**

Figura 2. Localidades de coleta dos Serrasalmídeos na bacia Amazônica e bacia do Orinoco. Círculos vermelhos, *Serrasalmus rhombeus*; laranjas, *Pygocentrus nattereri*; rosas, *Myloplus schomburgkii*; azuis, *Myleus setiger* **52**

Figura 3. Relações filogenéticas dos haplótipos COI e Dloop de *Serrasalmus rhombeus*. Topologia gerada por inferência bayesiana com valores estatísticos expressos em probabilidade posterior e *bootstrap* (máxima verossimilhança), respectivamente. As cores dos ramos correspondem às linhagens encontradas nesse táxon **58**

Figura 4. Rede de haplótipos com o gene COI e a Região Controle mitocondrial representando as dispersões de *Serrasalmus rhombeus* entre as bacias hidrográficas do Amazonas e Orinoco **59**

Figura 5. Grupos biológicos encontrados dentro de *Serrasalmus rhombeus* utilizando o gene COI e Região Controle do DNA mitocondrial no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam o mesmo grupo biológico. **Xin**: rio Xingu; **Toc-Ara**: rios Tocantins-Araguaia; **Ama**: localidades da calha do rio Amazonas; **Tap**: rio Tapajós; **Bra**: bacia do rio Branco; **Ori**: rio Orinoco; **Nha**: rio Nhamundá; **Ari**: rio Aripuanã; **Tro**: rio Trombetas; **Pit**: rio Pitinga; **Jar**: rio Jari **60**

Figura 6. Relações filogenéticas dos haplótipos COI e Dloop de *Pygocentrus nattereri*. Topologia gerada por inferência bayesiana com valores estatísticos expressos em

probabilidade posterior e bootstrap (máxima verossimilhança), respectivamente. As cores dos ramos correspondem às linhagens encontradas nesse táxon **62**

Figura 7. Redes de haplótipos com o gene COI e a Região Controle mitocondrial representando as dispersões de *Pygocentrus nattereri* entre drenagens da bacia amazônica, bacia do Tocantins-Araguaia e Maranhão **63**

Figura 8. Grupos biológicos encontrados dentro de *Pygocentrus nattereri* utilizando o gene COI e a Região Controle do DNA mitocondrial no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam o mesmo grupo biológico. **MA:** rio São Bento (Maranhão); **Tc-Ar:** rios Tocantins-Araguaia; **Tap:** rio Tapajós; **Gua:** rio São Domingos (bacia do Guaporé); **AM:** localidades da calha do rio Amazonas; **Bra:** rio Branco; **Tro:** rio Trombetas **64**

Figura 9. Relações filogenéticas dos haplótipos COI e Dloop de *Myloplus schomburgkii*. Topologia gerada por inferência bayesiana com valores estatísticos expressos em probabilidade posterior e *bootstrap* (máxima verossimilhança), respectivamente. As cores dos ramos correspondem às linhagens encontradas nesse táxon **65**

Figura 10. Rede de haplótipos com o gene COI e Região Controle mitocondrial representando as dispersões de *Myloplus schomburgkii* entre as bacias hidrográficas do Amazonas e Tocantins-Araguaia **66**

Figura 11. Grupos biológicos encontrados dentro de *Myloplus schomburgkii* utilizando o gene COI e Região Controle do DNA mitocondrial no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam o mesmo grupo biológico. **Ne:** rio Negro; **Bra:** rio Branco; **Nha:** rio Nhamundá; **Tap:** rio Tapajós; **Xin-Ara:** rios Xingu-Araguaia **67**

Figura 12. Relações filogenéticas dos haplótipos COI e Dloop de *Myleus setiger*. Topologia gerada por inferência bayesiana com valores estatísticos expressos em probabilidade posterior e *bootstrap* (máxima verossimilhança), respectivamente. As cores dos ramos correspondem às linhagens encontradas nesse táxon **69**

Figura 13. Redes de haplótipos com o gene COI e Região Controle mitocondrial representando as dispersões de *Myleus setiger* entre as bacias hidrográficas do Amazonas 70

Figura 14. Grupos biológicos encontrados dentro de *Myleus setiger* utilizando o gene COI e Região Controle do DNA mitocondrial no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam o mesmo grupo biológico. Tap: rio Tapajós; Xin: rio Xingu; Tc-Ar: rios Tocantins-Araguaia; Bra: rio Branco; Pit-Ari: Pitinga-Aripuanã 71

Figura 15. Hipóteses de tempo de divergência molecular entre os haplogrupos de Serrasalminae. Estimativas foram calibradas em 17 milhões de anos (Ma) para as piranhas (tempo de separação dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*) e 28 milhões de anos (Ma) para os pacus (tempo de separação de *Myloplus schomburgkii* e *Myleus setiger*). Retângulo verde, linhagens dentro de *Serrasalmus rhombeus*; azul, linhagens dentro de *Pygocentrus nattereri*; laranja, linhagens dentro de *Myloplus schomburgkii*; rosa, linhagens dentro de *Myleus setiger*. As bolinhas pretas nos nós indicam o tempo de divergência molecular em Ma entre as linhagens e as barras azuis o desvio padrão. Cores diferentes nos ramos indicam linhagens diferentes para cada táxon 73

Figura 16. História biogeográfica das espécies de Serrasalminae inferida através da análise de Dispersão-Vicariância (S-DIVA). (a) *Serrasalmus rhombeus*, (b) *Pygocentrus nattereri*, (c) *Myloplus schomburgkii* e (d) *Myleus setiger*. Setas vermelhas indicam eventos de dispersão e setas azuis eventos vicariantes com probabilidade = ou > 0.95 74

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Lista de espécies e morfotipos de Serrasalmídeos utilizados, linhagens moleculares apresentadas e suas respectivas áreas de distribuição (bacias de drenagens).

(-) ausência de linhagens **38**

Tabela 2. Valores de distância genética dentro e entre as espécies e morfotipos de Serrasalmídeos **41**

Capítulo II

Tabela 1. *Primers* usadas nas reações de PCR para amplificação do gene Citocromo C Oxidase subunidade I - COI e da Região Controle – DLoop do DNA mitocondrial **54**

Tabela 2. Valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas para as sequências concatenadas do gene COI e da Região Controle de *Serrasalmus rhombeus*. Valor significativo de $P < 0,002$ em negrito **60**

Tabela 3. Valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas para as sequências concatenadas do gene COI e da Região Controle de *Pygocentrus nattereri*. Valor significativo de $P < 0,002$ em negrito **64**

Tabela 4. Valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas para as sequências concatenadas do gene COI e da Região Controle de *Myloplus schomburgkii*. Valor significativo de $P < 0,002$ em negrito **67**

Tabela 5. Valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas para as sequências concatenadas do gene COI e da Região Controle de *Myleus setiger*. Valores significativos de $P < 0,002$ em negrito **71**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	10
Capítulo I: DNA Barcode de piranhas e pacus (Characiformes: Serrasalminidae): um estudo de ampla amostragem na Amazônia revelando alta diversidade críptica dentro dos Serrasalmídeos	11
Capítulo II: Filogeografia comparada de piranhas e pacus (Characiformes: Serrasalminidae) na bacia Amazônica	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	99

INTRODUÇÃO GERAL

A diversidade de peixes de água doce na região Neotropical é a maior do mundo, com mais de 5.000 espécies ocorrendo nos grandes sistemas de rios da América do Sul (REIS *et al.*, 2016) . A bacia Amazônica, com uma área geográfica de cerca de 6.500 km² e uma incomparável rede de rios e habitats aquáticos, congrega a maior riqueza ictiológica do planeta com mais de 2.000 espécies descritas (LUNDBERG *et al.*, 2010). Embora os estudos sobre a biodiversidade Neotropical sejam crescentes, nosso conhecimento sobre a diversidade de peixes dessa região bem como sobre os processos evolutivos que geram essa diversidade ainda são incipientes. Estima-se que 30 a 40% da ictiofauna neotropical ainda é desconhecida e, especialistas apontam para algo em torno de 2.000 espécies ainda a serem descritas (LÉVÊQUE *et al.*, 2008). Parte dessa situação deve-se a dificuldade de identificação morfológica das espécies devido principalmente à plasticidade fenotípica apresentada por muitos táxons. Essas características fazem a identificação taxonômica dessa fauna uma tarefa complexa, até quando são usadas abordagens moleculares para acessar a diversidade animal. Conhecer essa grande diversidade bem como entender seus processos geradores tem se tornado um importante desafio para a pesquisa científica, uma vez que habitats estão sendo constantemente alterados e o recurso cada vez mais explorado face ao aumentado crescimento populacional humano (TURNER *et al.*, 2004).

Estudos nas diversas áreas científicas têm mostrado que a região Neotropical tem uma historia evolutiva longa e complexa (HOORN *et al.*, 2010; LATRUBESSE *et al.*, 2010; MONTES *et al.*, 2015; MUNIS, 2013; ROSSETTI *et al.*, 2015), intimamente relacionada com a diversificação de sua biota (ALBERT, PETRY, REIS, 2011). Grande parte dessa diversificação teve início no Cretáceo, cerca de 120 a 100 Ma (ALBERT, PETRY, REIS, 2011) porem, nos últimos 90 milhões de anos, a América do Sul sofreu suas mudanças estruturais mais importantes, incluindo aí o intemperismo de antigos escudos, grandes incursões marinhas, elevação da cadeia dos Andes e de paleoarcos, reconfiguração do tamanho e padrão das principais bacias de drenagem da região, períodos de clima muito seco ou muito úmido (HOORN *et al.*, 2010), e essa complexa e diversa evolução da geomorfologia e das condições

ambientais promoveu uma incrível diversificação, principalmente, da biota na região (HUBERT & RENNO, 2006).

Várias hipóteses, baseadas em diferentes padrões de distribuição de táxons amazônicos tem sido propostas para explicar a origem e a manutenção da riqueza da fauna sul-americana (HUBERT & RENNO, 2006). Embora várias hipóteses de causas da especiação na Amazônia tenham sido propostas, a teoria dos refúgios, a qual postula que as flutuações climáticas do Pleistoceno causaram ciclos de contração e expansão das florestas tropicais, promovendo assim isolamento e diferenciação das espécies (HAFFER, 1997), e a hipótese de rios, a qual propõe que a formação das grandes drenagens na Amazônia teria dividido a distribuição de muitos táxons causando diferenciação (BATES, HACKETT, CRACRAFT, 1998), são as mais difundidas (RIBAS *et al.*, 2012). Essas hipóteses são mais testadas para explicar a evolução de organismos terrestres. Outras hipóteses postuladas para tentar entender essa incrível diversificação da biota amazônica são: a hipótese de Museu, na qual, segundo NORES (1999), as espécies teriam se originado por diferenciação alopática nas áreas altas da Amazônia durante os períodos de grandes incursões marinhas e se acumularam por dispersão nas terras baixas as quais teriam funcionado como “museus”; e a hipótese paleogeográfica onde as mudanças geológicas, como o soerguimento de paleoarcos resultantes da tectônica dos Andes durante o terciário, causariam especiação alopátrica, onde cada lado da barreira poderia abrigar biotas diferenciadas e espécies endêmicas (HOORN *et al.*, 1995; HUBERT & RENNO, 2006).

A estrutura do continente sul-americano é formada por várias unidades geotectônicas diferentes como: os crátons (Escudo Cristalino do Brasil Central e Escudo das Guianas), bacias intercratônicas (Orinoco, Amazonas, Parnaíba, São Francisco, Paraná), bacias pericratônicas (Iquitos, Llanos, Chacos, Pampas) entre outras. Essa diversidade de ambientes com suas características peculiares abriga uma biota diversa, e inclui grandes áreas de endemismo na Amazônia (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013).

A América do Sul passou por grandes mudanças na paisagem nos últimos 20 milhões de anos até chegar a sua forma atual. O soerguimento das porções Norte e Central da Cordilheira dos Andes, que iniciou há cerca de 15 milhões de anos, e culminou nos últimos 10 milhões de anos (LUNDBERG, 1998), influenciou

diretamente o estabelecimento dos cursos atuais dos rios da Amazônia, causando importante reorganização das drenagens do norte da América do Sul (HUBERT & RENNO, 2006). No início do Mioceno, um sistema fluvial que partia do cráton amazônico em direção as bacias sub Andinas a oeste, sendo daí desviado para o norte em direção ao mar do Caribe, foi substituído por um imenso sistema de áreas alagadas, conhecido como lago Pebas. No final do Mioceno, o sistema Pebas progressivamente desapareceu dando lugar ao transcontinental sistema Solimões-Amazonas (SACEK, 2014).

Com relação ao cráton amazônico, sua formação é muito mais antiga, datando do Pré-Cambriano, possivelmente a formação geológica mais antiga do mundo com cerca de quatro bilhões de anos (WESSELINGH & HOORN, 2011). Na América do Sul essa região é representada pelo Escudo das Guianas, ao norte da bacia amazônica, e pelos Escudos Cristalinos do Brasil Central, à sudeste da Amazônia. Os Escudos são principalmente compostos por rochas cristalinas de origem proterozóica, sobretudo granitos e gnaisses (HUBER, 2006). Pouco se sabe sobre a dinâmica dos rios que drenam os Escudos. No início do Mioceno essas drenagens fluíam para o oeste da Amazônia, porém com o surgimento do arco do Purus, os rios a leste dessa formação passaram a correr na direção do fluxo atual do rio Amazonas (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Embora muito mais antigos, os sistemas de drenagens do cráton amazônico parecem ter sofrido poucas mudanças (WESSELINGH & HOORN, 2011). No entanto, o papel da história física da região e sua influência sobre a origem, distribuição geográfica e ecologia das espécies de peixes da fauna neotropical ainda é pouco claro (WINEMILLER *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, estudos moleculares começaram a ser utilizados para reforçar as hipóteses morfológicas de evolução das espécies. Em 2003, utilizando um fragmento padronizado do Citocromo *c* oxidase subunidade I do DNA mitocondrial, Hebert e colaboradores propuseram um método para identificar espécies, o DNA Barcoding. Desde então milhões de espécimes pertencentes a milhares de espécies têm sido identificados, incluindo aí mais de 9.500 espécies de peixes (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007). A metodologia pressupõe que um pequeno fragmento do DNA mitocondrial (Citocromo *c* oxidase) de cerca de 650 pares de base pode ser utilizado como um identificador padronizado e único, tal como um código de barras, para a identificação de espécies (HEBERT *et al.*, 2003), utilizando métodos de distância para construção de árvores e usando o critério de monofilia

recíproca (HEBERT *et al.*, 2003; DESALLE, EGAN, SIDDALL, 2005). A efetividade dessa metodologia tem sido repetidamente demonstrada pela identificação de espécies de peixes marinhos e de água doce, com uma taxa de sucesso de mais de 90% (WARD *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013; CASTRO PAZ, BATISTA, PORTO, 2014; DE CARVALHO *et al.*, 2011). O gene citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) está presente no genoma mitocondrial e codifica parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria.

A ideia de utilizar um gene mitocondrial baseou-se nas características apresentadas por esse genoma, o qual possui um alto número de cópias por célula, apresenta tamanho reduzido (aproximadamente 16 kb) em comparação ao genoma nuclear, organização simples, herança estritamente materna com poucas exceções de herança paterna, e não sofre recombinação (AVISE, 2005; MATIOLI & FERNANDES, 2012). No DNA mitocondrial de vertebrados não existem íntrons, pseudogenes e, as repetições gênicas são raras (MATIOLI & FERNANDES, 2012). No caso do gene COI, devido a sua baixa liberdade mutacional, apresenta-se como um gene conservado intraespecificamente, o que o tem tornado um valioso marcador na identificação de espécies ou delimitação de ESUs (Unidade Evolutiva Significante) (ROE & SPERLING, 2007; DE CARVALHO *et al.*, 2011).

Para efetividade do DNA barcoding a divergência intraespecífica deve ser menor que a interespecífica, o que é chamado de *barcoding gap* ((HEBERT *et al.*, 2003; HEBERT *et al.*, 2004). Para tanto, é importante usar um grande número de indivíduos por espécie em uma amostragem representativa de sua distribuição, o que maximiza a chance de representar a variação intraespecífica existente na espécie (DESALLE, EGAN, SIDDALL, 2005). Existe um limite universal de distância genética, e as espécies são identificadas através da presença ou ausência de substituições de nucleotídeos distintos (RACH *et al.*, 2008).

O DNA barcoding tornou-se um meio promissor para a identificação de organismos em todas as fases da vida e, ganhou grande atenção como um meio universal para a identificação de organismos, podendo ser um meio rápido e confiável para: atribuir espécimes desconhecidos a um grupo taxonômico, diagnosticar prováveis unidades de conservação, e complementar os sistemas de identificação taxonômica (RACH *et al.*, 2008).

Muitos trabalhos que buscam avaliar a diversidade da ictiofauna de água doce mundial tem lançado mão dessa ferramenta para auxiliar a identificação

morfológica de muitas espécies de peixes e, na grande maioria desses trabalhos, o número de espécies escondidas sob uma aparente similaridade morfológica e de habitats foi grande. Um exemplo clássico de como o barcode pode revelar diversidade críptica é aquele desenvolvido por (APRIL *et al.*, 2011). Analisando a ictiofauna de água doce da América do Norte, os autores encontraram que, entre as 752 espécies morfológicas utilizadas no trabalho, 138 delas foram representadas por 347 espécies candidatas, o que representou um incremento de 28% na diversidade de espécies de peixes daquela região. De forma similar, (PEREIRA *et al.*, 2013) analisaram a ictiofauna da região Neotropical e, entre as 254 espécies morfológicas analisadas, 14 delas apresentaram linhagens intraespecíficas com divergência acima de 2% representando pelo menos 28 possíveis novas espécies. Outros trabalhos utilizaram a metodologia do DNA barcoding para analisar a diversidade dentro de alguns gêneros de peixes amazônicos tais como os estudos desenvolvidos para *Hyphessobrycon* (CASTRO-PAZ *et al.*, 2014), para *Nannostomus* (BENZAQUEM *et al.*, 2015) e *Curimatopsis* (MELO *et al.*, 2016a). Em todos os casos o número de espécies moleculares foi superior ao número de espécies morfológicas analisadas.

Muitos estudos filogeográficos têm sido realizados com táxons amazônicos para tentar verificar qual, ou quais processos foram os responsáveis pela incrível diversificação da biota na América do Sul, como aqueles desenvolvidos por: PATTON, DA SILVA, MALCOLM, 1994; RIBAS *et al.*, 2012; LEITE & ROGERS, 2013; LEITE, KOK, WEKSLER, 2015 com pássaros e pequenos mamíferos. Os peixes também têm sido bastante utilizados nesses estudos, sendo analisados desde os níveis taxonômicos mais superiores, supra-específicos (ordens, famílias), até o menor nível de classificação, as espécies. HUBERT & RENNO (2006) utilizaram a distribuição dos peixes da ordem Characiformes na região Neotropical para investigar seus padrões biogeográficos. Os principais achados desse trabalho foram 11 áreas de endemismo para os Characiformes Neotropicais e um forte suporte para uma diferenciação Leste-Oeste desses peixes na bacia Amazônica. Os autores concluem que o estabelecimento da moderna fauna de Characiformes na América do Sul não é o resultado de apenas um processo, mas sim a interação de incursões marinhas, soerguimento de paleoarcos e conexões históricas que permitiram a dispersão desses táxons através de várias bacias de drenagens. Outros trabalhos mostram a predominância desses diferentes processos na distribuição de grupos mais específicos de peixes na América do Sul e na bacia Amazônica como

aquele realizado por HUBERT e colaboradores (2007) para as piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, onde os autores concluem que a diversificação desses táxons foi fortemente influenciada pelos antigos arcos estruturais que moldaram a distribuição de muitas bacias de drenagens na América do Sul. FARIAS & HRBEK (2008), analisando os padrões de diversificação dos ciclídeos do gênero *Symphysodon* na bacia Amazônica, concluíram que esses peixes se encontram em processo de especiação e atribuíram a alguns processos geológicos, tais como a quebra do arco do Purus e as flutuações no nível do mar no Plio-Pleistoceno, o padrão de diferenciação encontrado nesses táxons.

Muitos desses trabalhos têm utilizado métodos moleculares para tentar elucidar os processos de evolução da biota amazônica, sobretudo marcadores mitocondriais (FARIAS & HRBEK, 2008; HUBERT *et al.*, 2007a; COOKE, CHAO, BEHEREGARAY, 2009; FREDERICO *et al.*, 2012). Este genoma está entre os fragmentos de DNA mais usados para estudos de níveis e padrões de distribuição da variabilidade genética entre populações de espécies animais (AVISE, 2005), e comumente tem sido utilizado em estudos de filogenia molecular (BOORE, 1999), e filogeografia (BROWN, 2008).

Em animais, o DNA mitocondrial é uma molécula circular, com aproximadamente 16 kb de extensão, a qual possui 37 genes sendo 13 deles codificadores para proteínas da fosforilação oxidativa, como a subunidade I do Citocromo C Oxidase (COI) por exemplo. Além destes 37 genes, esse genoma também possui a Região Controle, mais conhecida como D-loop, de aproximadamente 0,8 kb, cuja função é exercer controle sobre a replicação do DNA mitocondrial e a transcrição de RNA. Essa região evolui de forma mais rápida (liberdade de substituição nucleotídica) que o resto dos genes, uma vez que não codifica para uma proteína e, portanto, não está sob seleção, apresentando assim uma alta variabilidade intraespecífica, permitindo detectar diferenças genéticas no nível populacional (AVISE *et al.*, 1987).

As variantes (sequências) desse genoma, conhecidas como haplótipos, registram a história matrilinear de eventos mutacionais, os quais são diferenciados quando uma população é fragmentada no passado e se mantém geneticamente isolada (interrupção ao fluxo gênico), o que inevitavelmente leva a uma divergência proporcional ao tempo de separação devido à deriva genética e mutação. De forma contrária, a presença de fluxo gênico homogeneiza as frequências alélicas e

haplotípicas, inibindo assim a especiação e o alcance da monofilia recíproca (SLATKIN, 1985). Todas essas características tornam essa molécula uma excelente ferramenta para estudos filogeográficos em espécies animais.

JUSTIFICATIVA

Os peixes são os mais numerosos membros entre os vertebrados, com mais 28.000 espécies descritas (POUGH, JANIS, HEISER, 2008), representando pouco mais da metade de todos os vertebrados conhecidos. Destas, 41% habitam estritamente ambientes de água doce (NELSON, 2006). A ictiofauna de peixes de água doce da América do Sul é a mais rica do mundo e apresenta uma grande diversidade biológica e adaptativa. REIS *et al.* (2016) relataram a ocorrência de 5.160 espécies de peixes para essa região e, estimaram uma diversidade total em torno de 8.000 a 9.000 espécies de peixes de água doce para esse continente. BUCKUP, MENEZES, GHAZZI (2007) registraram a ocorrência de 2.587 espécies de peixes de água doce para o Brasil com a maioria delas ocorrendo na bacia Amazônica. No entanto baseado em SOARES *et al.* (2008), a estimativa mais realista é que essa bacia abriga mais da metade das espécies descritas por REIS *et al.* (2003) para a região Neotropical. Todavia o conhecimento dessa fauna é ainda incompleto como atestam as dezenas de espécies de peixes descritas anualmente no Brasil e, portanto é de se prever que a riqueza total efetiva seja ainda muito maior.

A diversidade de peixes de água doce do Brasil deve-se principalmente a presença de diversos sistemas hidrográficos, com considerável distinção ictiofaunística entre si. Das áreas biogeográficas sugeridas por VARI (1988) e MENEZES (1996) para peixes de água doce da América do Sul, a bacia Amazônica é de longe a mais rica em espécies no Brasil e, essa grande riqueza deve-se não apenas a sua grande área (dentro do Brasil, com aproximadamente 4.800.000 km²), mas, também a fatores históricos, juntamente com sua heterogeneidade ecológica e complexidade geomorfológica (GOULDING *et al.*, 2003; LUNDBERG, 1998).

Além da enorme diversidade de espécies de peixes, existe a diversidade críptica que é aquela que não pode ser ou é dificilmente detectada usando

ferramentas tradicionais morfológicas e, que pode estar presente em uma grande parte da diversidade biológica encontrada nos ecossistemas. Essa diversidade parece particularmente evidente nos peixes Serrasalmídeos os quais apresentam grande número de espécies com pouca ou nenhuma variação morfológica aparente.

Esses peixes constituem um grupo monofilético, o qual possui cerca de 90 espécies distribuídas em 17 gêneros (incluindo a espécie fóssil *Megapiranha paranensis*, (CIONE *et al.*, 2009). São endêmicos das regiões neotropicais e, estão amplamente distribuídos em todos os maiores sistemas de rios da América do Sul, sendo abundantes nas bacias Amazônica e do Orinoco e, ocorrendo também na bacia do sistema Paraná-Paraguai e na bacia do rio São Francisco (REIS *et al.*, 2003). Habita uma grande variedade de corpos de água, incluindo o canal principal dos rios, os lagos, a floresta alagada até ambientes de corredeiras e cachoeiras nas cabeceiras dos rios (GOULDING, 1980). Muitas espécies de Serrasalmídeos, principalmente dos gêneros *Piaractus*, *Colossoma* e *Mylossoma* são economicamente importantes, representando uma importante fração da pesca comercial no Amazonas e também são utilizados na aqüicultura (MARSHALL, 1995). Outras espécies são importantes para o mercado de peixes ornamentais como as espécies do gênero *Metynnis*. Representantes dos gêneros *Mylesinus*, *Myleus* e *Tometes* estão entre as espécies de peixes mais importantes para alimentação nas comunidades indígenas amazônicas.

Por muito tempo esse grupo de peixes foi considerado uma subfamília dentro da família Characidae (MACHADO-ALLISON, 1985). No entanto, um estudo filogenético de CALCAGNOTTO *et al.* (2005) sugere fortemente que Characidae não é monofilética e que os Serrasalmídeos não são relacionados aos táxons originalmente localizados dentro da subfamília Characinae ou a outras subfamílias dentro de Characidae e sim, que eles são mais relacionados com os Anostomídeos. Esses argumentos suportam o status de família para as piranhas e pacus. Suas relações com outras famílias dentro da ordem Characiformes, no entanto, permanecem incertas (ORTÍ & MEYER, 1997; CALCAGNOTTO, SCHAEFER, DESALLE, 2005; HUBERT *et al.*, 2007a). Na região Amazônica, a diversidade de pacus e piranhas é muito grande e nos últimos anos esse grupo vem sendo estudado sob diferentes aspectos, ou seja, morfológicos (JÉGU & SANTOS, 2002; JEGU, TITO DE MORAIS, SANTOS, 1992) genéticos (DE ALMEIDA-VAL *et al.*, 1992; TEIXEIRA *et al.*, 2006), parasitológicos (KRITSKY, BOEGER, VAN EVERY, 1992), reprodutivos (LEÃO *et al.*, 1991; MACIEL, SOARES, PRESTES, 2011),

citogenéticos (SANTANA *et al.*, 2011; NAKAYAMA *et al.*, 2002) e moleculares (ORTÍ *et al.*, 1996; PORTO, 1999; HUBERT *et al.*, 2006; FREEMAN *et al.*, 2007). No entanto, estudos sobre a diversidade genética desses peixes na América do Sul são limitados a algumas espécies ou gêneros nunca considerando toda a família Serrasalminidae. Estudos sobre a estrutura populacional de Serrasalmídeos também são poucos sendo realizados, sobretudo com espécies de importância econômica como o tambaqui *Colossoma macropomum* (SANTOS, RUFFINO, FARIAS, 2007) e a pirapitinga *Piaractus brachypomus* (ESCOBAR *et al.*, 2015).

Desvendar essa diversidade críptica nos Serrasalmídeos, quantificar a real diversidade desse grupo nos mais diferentes ambientes amazônicos bem como caracterizar sua estrutura populacional são fundamentais para conhecimento dessa diversidade o que nos permite analisar melhor as populações desses peixes que constituem um importante recurso amazônico.

OBJETIVO GERAL

- Investigar a diversidade dos peixes Serrasalmídeos na bacia Amazônica, e analisar comparativamente seus padrões de diversificação dentro dessa bacia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a efetividade do DNA barcoding na identificação das espécies de Serrasalmidae
- Verificar a existência de linhagens genéticas divergentes dentro dos Serrasalmídeos
- Inferir prováveis padrões de diversificação de pacus e piranhas na bacia amazônica considerando diferentes estilos de vida
- Estimar o tempo de divergência das linhagens de Serrasalmídeos associando a prováveis eventos geológicos ou climáticos que moldaram a distribuição da biota amazônica

CAPITULO I

DNA BARCODE DE PIRANHAS E PACUS (CHARACIFORMES: SERRASALMIDAE): UM ESTUDO DE AMPLA AMOSTRAGEM NA AMAZÔNIA REVELANDO ALTA DIVERSIDADE CRÍPTICA DENTRO DOS SERRASALMÍDEOS

Orientador: Dr. Tomas Hrbek

Co-orientador: Dr. Rupert Collins

Manaus/2016

RESUMO

Os peixes constituem o mais diverso grupo de vertebrados vivos, chegando a representar mais de 50% das mais de 54.000 espécies de vertebrados do planeta. Só a ictiofauna da região Neotropical representa cerca de 13% de toda essa diversidade e é considerada a mais rica do mundo, com mais de 5.000 espécies de água doce reconhecidas. Embora muitos estudos sobre a biodiversidade tenham aumentado nosso conhecimento sobre a diversidade de peixes, estima-se que cerca de 30 a 40% da ictiofauna Neotropical não tenha sido descrita ainda, devido, sobretudo a dificuldade de identificação morfológica das espécies em razão da grande plasticidade fenotípica apresentada por muitos táxons. O DNA barcoding é uma metodologia de delimitação de espécies que propõe a utilização de um pequeno fragmento do DNA mitocondrial (Citocromo *c* oxidase) de aproximadamente 650 pares de base como um identificador padronizado e único, tal como um código de barras. Essa metodologia tornou-se um meio promissor para a identificação de organismos em todas as fases da vida, podendo ser um meio rápido e confiável para: atribuir espécimes desconhecidos a um grupo taxonômico, diagnosticar prováveis unidades de conservação, e complementar os sistemas de identificação taxonômica. A família Serrasalminidae é constituída por cerca de 90 espécies válidas, distribuídas em 17 gêneros. É endêmica das regiões neotropicais e, está amplamente distribuída em todos os maiores sistemas de rios da América do Sul. Habita uma grande variedade de ambientes, incluindo o canal principal dos rios, os lagos, a floresta alagada até ambientes de corredeiras e cachoeiras com fortes correntezas. Na região Amazônica, a diversidade de pacus e piranhas é muito grande, no entanto a taxonomia desse grupo não é bem resolvida ainda. Dada às ameaças constantes a manutenção da diversidade dessa família, sob a forma de pesca exploratória e uma constante destruição de habitats devido a construção de barragens para geração de energia elétrica, definir o status taxonômico dos membros dessa família bem como avaliar a real diversidade desse grupo é necessário para conservação e utilização racional desse importante recurso. Foram sequenciados em média 630 pares de base do gene mitocondrial Citocromo *c* oxidase subunidade I para 926 espécimes de Serrasalmídeos pertencentes a 55 espécies nominais e 11 táxons identificados apenas no nível de gênero, representando todos os 16 gêneros vivos dessa família. A média de divergência genética variou de 0% a 13% dentro das espécies e de 0% a 11% entre as espécies. A análise de Neighbor-Joining mostrou que muitas das espécies usadas nesse trabalho (57.3%) formaram grupos monofiléticos, e puderam ser discriminadas corretamente. No entanto, boa parte dos táxons (29), se mostraram parafiléticos e apresentaram altos valores de divergência intraespecífica. O DNA barcoding foi efetivo em discriminar aproximadamente 60% dos Serrasalmídeos, das 66 espécies morfológicas foram encontradas 82 espécies moleculares.

Palavras-chaves: Peixes Serrasalmídeos, DNA barcoding, diversidade críptica, bacia amazônica

INTRODUÇÃO

Os peixes constituem o mais diverso grupo de vertebrados vivos, chegando a representar mais de 50% das mais de 54.000 espécies de vertebrados do planeta (NELSON, 2006). Só a ictiofauna da região Neotropical representa cerca de 13% de toda essa diversidade e é considerada a mais rica do mundo (REIS *et al.*, 2016), com mais de 5.000 espécies de água doce reconhecidas. Essa região representa 25% da ictiofauna de águas continentais do mundo e, embora muitos estudos sobre a biodiversidade tenham aumentado nosso conhecimento sobre a diversidade de peixes, estima-se que cerca de 30 a 40% da ictiofauna Neotropical não tenha sido descrita ainda (REIS *et al.*, 2003). Parte dessa situação deve-se à dificuldade de identificação morfológica das espécies devido principalmente à plasticidade fenotípica apresentada por muitos táxons. Essas características fazem a identificação taxonômica dessa fauna um grande desafio, inclusive quando são usadas abordagens moleculares para acessar a diversidade animal.

Em 2003, a utilização de um fragmento padronizado do citocromo *c* oxidase subunidade I do DNA mitocondrial foi proposto por HEBERT e colaboradores como um método para identificar espécies, o DNA Barcoding. Desde então milhões de espécimes pertencentes a milhares de espécies têm sido identificados, incluindo aí mais de 9.500 espécies de peixes (RATNASINGHAM *et al.*, 2007). A metodologia pressupõe que um pequeno fragmento do DNA mitocondrial (Citocromo *c* oxidase) de cerca de 650 pares de base pode ser utilizado como um identificador padronizado e único, tal como um código de barras, para a identificação de espécies (HEBERT *et al.*, 2003), utilizando métodos de distância para construção de árvores e usando o critério de monofilia recíproca (HEBERT *et al.*, 2003; DESALLE *et al.*, 2005). A efetividade dessa metodologia tem sido repetidamente demonstrada pela identificação de espécies de peixes marinhos e de água doce, com uma taxa de sucesso de mais de 90% (WARD *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013; CASTRO PAZ, BATISTA, PORTO, 2014; DE CARVALHO *et al.*, 2011). O gene citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) está presente no genoma mitocondrial e codifica parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria. A ideia de utilizar um gene mitocondrial baseou-se nas características apresentadas por esse genoma tais como, possuir um alto número de cópias por célula, apresentar tamanho reduzido (aproximadamente 16 kb) em

comparação ao genoma nuclear, organização simples, possuir herança estritamente materna com poucas exceções de herança paterna, e por não sofrer recombinação (AVISE, 2005; MATIOLI & FERNANDES, 2012). No DNA mitocondrial de vertebrados não existem íntrons, pseudogenes e, as repetições gênicas são raras (MATIOLI & FERNANDES, 2012). O DNA barcoding tornou-se um meio promissor para a identificação de organismos em todas as fases da vida e, ganhou grande atenção como um meio universal para a identificação de organismos, podendo ser um meio rápido e confiável para: atribuir espécimes desconhecidos a um grupo taxonômico, diagnosticar prováveis unidades de conservação, e complementar os sistemas de identificação taxonômica (RACH et al., 2008).

Para efetividade do DNA barcoding a divergência intraespecífica deve ser menor que as interespecíficas, o que é chamado de *barcoding gap* (HEBERT et al., 2003; HEBERT et al., 2004). Para tanto, é importante usar um grande número de indivíduos por espécie em uma amostragem representativa de sua distribuição, o que maximiza a chance de representar a variação intraespecífica existente na espécie (DESALLE et al., 2005). Existe um limite universal de distância genética, e as espécies são identificadas através da presença ou ausência de substituições de nucleotídeos distintos (RACH et al., 2008).

O DNA barcoding tornou-se um meio promissor para a identificação de organismos em todas as fases da vida e, ganhou grande atenção como um meio universal para a identificação de organismos, podendo ser um meio rápido e confiável para: atribuir espécimes desconhecidos a um grupo taxonômico, diagnosticar prováveis unidades de conservação, e complementar os sistemas de identificação taxonômica (RACH et al., 2008).

A família Serrasalmidae constituída por cerca de 90 espécies válidas (ESCHMEYER & FONG, 2016) está distribuídas em 17 gêneros (incluindo a espécie fóssil *Megapiranha paranensis*, (CIONE et al., 2009)). Essa família é endêmica das regiões neotropicais e, está amplamente distribuída em todos os maiores sistemas de rios da América do Sul, sendo abundante nas bacias Amazônica e do Orinoco e, ocorrendo também na bacia do sistema Paraná-Paraguai e na bacia do rio São Francisco (REIS et al., 2003). Habita uma grande variedade de corpos de água, incluindo o canal principal dos rios, os lagos, a floresta alagada até ambientes de corredeiras e cachoeiras com fortes correntezas (GOULDING, 1980). Por muito tempo os Serrasalmídeos foram considerados uma subfamília dentro da família

Characidae, no entanto, estudos filogenéticos recentes, (CALCAGNOTTO, SCHAEFER, DESALLE, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011; HASHIMOTO *et al.*, 2011) mostram que as piranhas e pacus formam um grupo bem definido dentro da Ordem Characiformes, a família Serrasalminidae. No entanto, as relações entre as espécies e gêneros dentro dessa família ainda não foram totalmente esclarecidas.

As primeiras tentativas de classificação dos gêneros de Serrasalminidae, baseadas, sobretudo no arranjo e na disposição dos dentes, datam de 1844, com os trabalhos de MULLER & TROSCHER, onde os autores reconhecem os membros dessa família compondo um grupo homogêneo. A primeira separação desse grupo ocorre em 1915, com EIGENMANN, o qual divide os táxons em duas subfamílias, as quais posteriormente, em 1929 seriam agrupadas por NORMAN em uma única subfamília, Serrasalminae. MACHADO-ALLISON (1983) foi o primeiro autor a realizar uma análise cladística dessa família utilizando caracteres morfológicos. Nessa análise, o autor volta a separar os membros em dois clados, no entanto mantém o status de subfamília para o grupo dos pacus e piranhas. A classificação de MACHADO-ALLISON (1983) é semelhante àquela proposta por EIGENMANN (1915), diferindo apenas no posicionamento de *Metynnis* e *Catoprion*, os quais pela primeira vez são agrupados com as piranhas. Trabalhos subsequentes, já incluindo caracteres moleculares, encontram a subfamília dividida em três grupos e não dois, como proposto anteriormente (ORTÍ *et al.*, 1996). Em 2008, já adotando o status de família para o grupo (depois dos resultados de CALCAGNOTTO, SCHAEFER, DESALLE, (2005)), ORTÍ e colaboradores analisaram novamente as relações dos membros dessa família utilizando os genes 12S e 16S ribossomais e a região controle do DNA mitocondrial, e obtiveram a mesma divisão para a família (três clados), no entanto, encontram *Acnodon* monofilético e fortemente relacionada ao grupo *Myleus*. Outros trabalhos com Serrasalminidae encontram o mesmo padrão de agrupamento dos gêneros (CIONE *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011; THOMPSON *et al.*, 2014).

Com relação aos grandes grupos de Serrasalminidae as relações internas do clado Pacu e clado Piranha são relativamente bem resolvidas: no primeiro, *Colossoma* e *Mylossoma* algumas vezes se mostram como gêneros irmãos e mais relacionados à *Piaractus*, outro gênero desse grupo (ORTÍ *et al.*, 1996; CALCAGNOTTO; SCHAEFER, DESALLE, 2005; FREEMAN *et al.*, 2007; ORTÍ *et al.*, 2008; THOMPSON *et al.*, 2014, outras vezes *Piaractus* e *Colossoma* são mais relacionados entre si (MACHADO-ALLISON, 1985; CIONE *et al.*,

2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Porém, esse grupo sempre aparece numa posição basal dentro de Serrasalminae, exceto no trabalho de CALCAGNOTTO, SCHAEFER, DESALLE, (2005), onde *Piaractus* sozinho aparece como o grupo mais basal dessa família, com *Mylossoma* e *Colossoma* mais próximos entre si formando um grupo mais relacionado com as piranhas. A autora no entanto, pede que o esquema por ela encontrado seja analisado com cautela, uma vez que análise com esse detalhamento taxonômico não foi o objetivo de seu trabalho. Dentro das piranhas, indefinições parecem ocorrer apenas nas relações entre *Pristobrycon* e *Serrasalmus*. MACHADO-ALLISON em 1985, em uma análise morfológica já havia observado algumas espécies de *Pristobrycon* mais relacionadas com o gênero *Serrasalmus*, e apenas *P. striolatus* mais separada deste e mais próxima de *Pygopristis*. Esse padrão de relacionamento das espécies dos dois gêneros aparece em todas as análises subsequentes. ORTÍ *et al.* (1996) encontra *P. striolatus* mais relacionada com *Catoprion mento* e as outras espécies agrupadas com *Serrasalmus*. Nesse trabalho, o autor não inclui o gênero *Pygopristis*, porém em 2008, ORTÍ e colaboradores encontram a mesma separação de *P. striolatus*, mas dessa vez mais relacionada com *Catoprion mento* e *Pygopristis denticulata*, e restringem *Pristobrycon* a uma única espécie, *P. striolatus*, alocando as demais espécies desse gênero em *Serrasalmus*.

Dentro do grupo *Myleus* as relações entre seus membros ainda são confusas. GÉRY (1977), baseado na morfologia dentária, considerou quatro subgêneros dentro de *Myleus* (*Myloplus*, *Paramyloplus*, *Prosomyloplus* e *Myleus*). MACHADO-ALLISON & FINK, (1995), no entanto, rejeitam essa classificação alegando falta de autapomorfias que suportem essa subdivisão. Em 2002, JÉGU & SANTOS reavaliaram o material-tipo atribuído a *Myleus* e seus subgêneros por GÉRY em 1977, e concluíram que somente *Myleus setiger* e *M. knerii* pertenciam a esse gênero, realocando as outras espécies para o gênero *Myloplus*. Nesse mesmo ano, JÉGU *et al.* (2002) reabilitaram o gênero *Tometes*, o qual havia sido colocado em sinonímia com *Myleus setiger* desde 1860. Desde as análises morfológicas de MACHADO-ALLISON, (1983) os gêneros do grupo *Myleus* já se mostravam parafiléticos e, nas análises mais recentes incluindo dados moleculares, esse padrão se repete. ORTÍ *et al.* (1996), na primeira análise molecular dos membros de Serrasalminae, encontraram espécimes de pacus não relacionadas a nenhum dos três gêneros utilizados na análise (*Myleus*, *Mylesinus* e *Utiaritchthys*) e sugerem portanto, um novo gênero dentro

dessa família para abrigar esses espécimes. Em 2008, ORTÍ e colaboradores utilizam um maior número de espécies de pacus em mais uma análise molecular de Serrasalmidae, e encontram um clado composto de *Myleus setiger*, *Mylesinus* e *Tometes* relativamente bem suportado e outro clado formado por espécies do gênero *Myloplus* com alto suporte estatístico. THOMPSON *et al.* (2014) sugeriram que o grupo *Myleus* abrigava espécies crípticas e uma grande diversidade taxonômica no nível de gênero.

Muitas espécies dessa família, principalmente dos gêneros *Piaractus*, *Colossoma* e *Mylossoma* são economicamente importantes, representando uma importante fração da pesca comercial na Amazônia e também são utilizados na aquicultura (MARSHALL, 1995). Espécies do gênero *Metynnis* são importantes para o mercado de peixes ornamentais, enquanto as espécies dos gêneros *Mylesinus*, *Myleus* e *Tometes* estão entre as espécies de peixes mais importantes para alimentação nas comunidades indígenas amazônicas (SANTOS *et al.*, 1997; PAGEZY & JÉGU, 2002).

Na região Amazônica, a diversidade de pacus e piranhas é muito grande e nos últimos anos esse grupo vem sendo estudado sob diferentes aspectos, ou seja, morfológicos (JÉGU, TITO DE MORAIS, SANTOS, 1992; JÉGU, SANTOS, 2001; ANDRADE, GIARRIZZO, JÉGU, 2013; OTA, 2015) genéticos (DE ALMEIDA-VAL *et al.*, 1992; TEIXEIRA *et al.*, 2006), parasitológicos (VAN EVERY & KRITSKY, 1992; KRITSKY, BOEGER & VAN EVERY, 1992), reprodutivos (MACIEL, SOARES, PRESTES, 2011), citogenéticos (PORTO, 1999; SANTANA *et al.*, 2011; RIBEIRO, MATOSO, FELDBERG, 2014; NAKAYAMA, FELDBERG, BERTOLLO, 2012) e moleculares (ORTÍ *et al.*, 1996; HUBERT *et al.*, 2006; FREEMAN *et al.*, 2007; ORTÍ *et al.*, 2008; THOMPSON *et al.*, 2014).

Dada às ameaças constantes a manutenção da diversidade dessa família, materializadas sob a forma de uma pesca exploratória intensa sobre alguns táxons, seja para consumo humano ou para um crescente mercado de aquarofilia, além da constante destruição de habitats de alguns grupos como resultado da construção desenfreada de barragens para geração de energia elétrica, definir o status taxonômico dos membros dessa família bem como conhecer suas relações filogenéticas, associado claro, a um melhor conhecimento da biologia das espécies e suas interações ecológicas, são ações fundamentais e necessárias para conservação e utilização racional desse importante recurso.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem de peixes

As coletas para retirada de tecidos foram realizadas nos rios Tocantins, Araguaia, Xingu, Tapajós e Aripuanã no Escudo Brasileiro; nos rios Jari, Paru, Trombetas, Nhamundá, Jatapu, Pitinga, Branco, Negro e Orinoco no Escudo das Guianas, além de outras localidades da calha Solimões-Amazonas e dos rios Javari, Juruá, Japurá, Purus e Guaporé. Também foram realizadas coletas na bacia do rio São Francisco e no rio São Domingos no estado do Maranhão (Figura 01). Nas áreas de corredeiras as coletas foram realizadas com a ajuda de pescadores locais que conhecem as áreas de pedrais. A amostragem foi realizada com a utilização de baterias de malhadeiras, tarrafas e anzol. Nas áreas fora de corredeiras, foram explorados os mais diversos ambientes possíveis onde ocorrem os Serrasalmídeos.

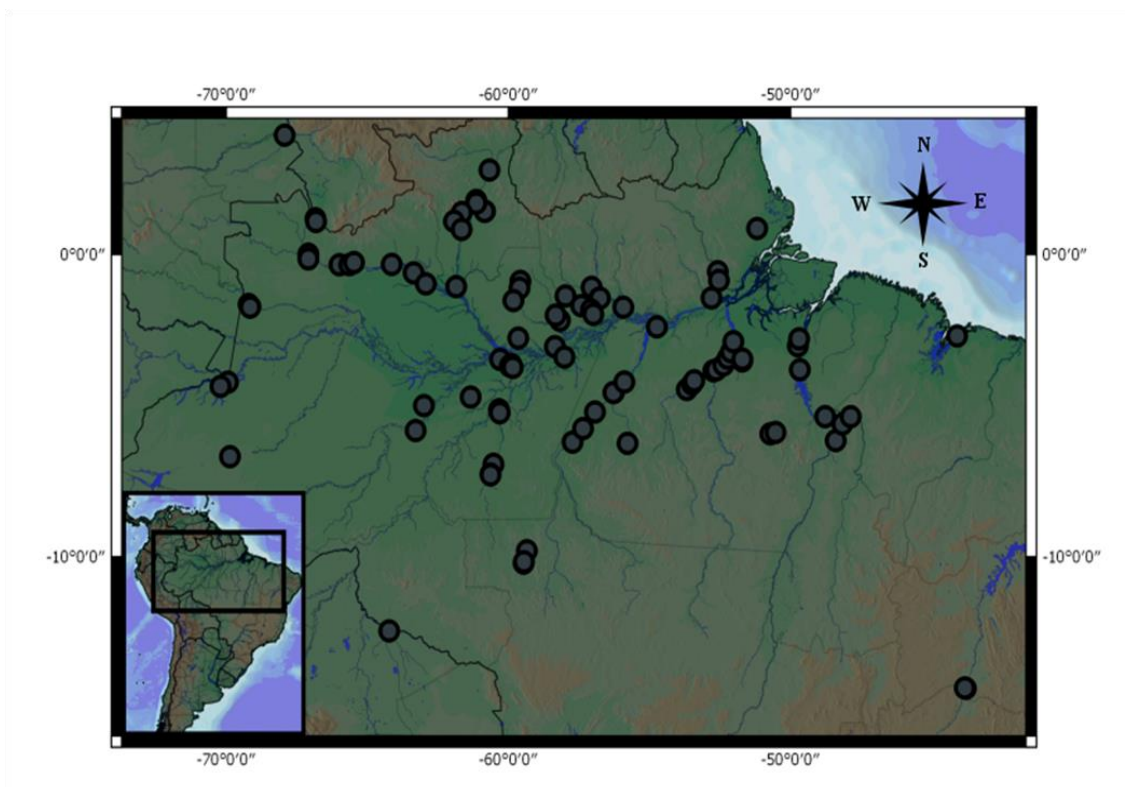


Figura 01. Localidades amostradas na bacia do rio Orinoco, bacia Amazônica e bacia do rio São Francisco

Os exemplares coletados, quando necessário, foram sacrificados com uma dose letal de anestésico a base de óleo de cravo (Eugenol), e triados. Indivíduos de pequeno porte foram preservados em álcool 95% e, dos indivíduos maiores foi retirada a nadadeira peitoral e o tecido muscular associado os quais foram preservados em álcool 95%, e o resto do exemplar fixado em formalina (10%). As amostras de tecido foram depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal da Universidade Federal do Amazonas - UFAM e, os *vouchers* na Coleção Ictiológica do INPA. A identificação taxonômica das espécies foi feita por especialistas no grupo e com uso de chaves dicotômicas, literatura especializada, e comparação com exemplares depositados em museus e coleções científicas. Todas as coletas foram realizadas com autorização do IBAMA/MMA.

Marcadores moleculares e extração de DNA

Para a identificação molecular dos Serrasalmídeos foi utilizado o gene mitocondrial Citocromo *c* oxidase subunidade I (COI). O DNA genômico foi extraído seguindo os procedimentos gerais de: rompimento da célula, separação dos ácidos nucleicos através da remoção de proteínas e restos celulares e, purificação final. Para tanto foi utilizada uma solução de CTAB 2% (NaCl, EDTA 0,5M, Tris HCL 1M, PVP polivinil) (DOYLE; DOYLE, 1987), com algumas modificações e adição de Proteinase *K*.

Amplificação do gene COI

O gene mitocondrial COI foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o coquetel de primers Mafish (FishF2_FishR2 e VF2_VR1d) (IVANOVA et al., 2007). As reações de PCR tiveram um volume final de 15 µl sendo: 1µl de DNA genômico total; 1,2 µl de MgCl₂ (25mM); 1,2 µl de DNTP (10mM); 1,5 µl de Buffer 10X(75 mM Tris HCL, 50 mM KCL, 20 mM (NH₄)₂SO₄); 1,5 µl do coquetel de primers; 0,3 µl de Taq DNA Polimerase (1U) e 8,3 µl de H₂O. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto (uma única vez), 35 ciclos de desnaturação a 93°C por 10 segundos; anelamento a 50°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 1:30 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos (uma única vez).

Sequenciamento

Os PCRs de sequenciamento tiveram um volume final por amostra de 10 µl, sendo: 2 µl de DNA amplificado e purificado; 2 µl do primer; 0,5 µl do *Big Dye*; 1,45 µl de tampão do *Big Dye* e 4,5 µl de água *miliq.* Em seguida, as amostras foram submetidas ao termociclador *Eppendorf* com ciclos assim programados: 10 segundos a 96° para desnaturação das fitas complementares, 15 segundos a 50°C para o pareamento dos primers e 4 minutos a 60°C para a extensão da região sequenciada. Em seguida, as amostras de DNA resultantes deste PCR foram submetidas ao protocolo de precipitação Etanol 100%/EDTA. A placa contendo o DNA foi então submetida a eletro-injeção e as sequencias nucleotídicas foram determinadas pelo sequenciador automático *ABI 3500*.

Edição das sequencias e análise dos dados

As sequencias foram alinhadas utilizando a ferramenta de alinhamento MAFFT, implementada no software Geneious 7.0.6 (KEARSE et al., 2012) e editadas manualmente. Estas foram então traduzidas em aminoácidos hipotéticos para verificação de inserções, deleções e códons de parada inesperados. As distancias intra e interespecíficas foram calculadas utilizando o modelo de distancia Kimura-2-Parâmetros (KIMURA, 1980) e, para a determinação dos grupos específicos, utilizou-se o método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbour-Joining*, NJ) (SAITOU; NEI, 1987) sob o modelo *K2P* (KIMURA, 1980) para a representação gráfica dos padrões de divergência entre as espécies. A confiabilidade de cada nó foi estimada pelo método de *bootstrap*, com 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985).

RESULTADOS

Foram sequenciados em média 630 pares de base do gene mitocondrial Citocromo *c* oxidase subunidade I para 926 espécimes de peixes pertencentes a 55 espécies nominais e 11 táxons identificados apenas no nível de gênero, representando todos os 16 gêneros viventes da família Serrasalminidae (Tabela 01). O número de indivíduos por espécie variou de um (*Myloplus planquetei*, *Tometes makue*, *T. trilobatus*, espécies com distribuição restrita às drenagens do Escudo das Guianas) a 80 (*Serrasalmus rhombeus*, com ampla distribuição na América do Sul). Foram

adicionadas ao banco de dados 110 sequencias de Serrasalminae baixadas do Bold (*Barcode of Life Data System*). Essas sequências foram provenientes principalmente da bacia do rio Paraná, o qual não foi amostrado em nossas coletas, e do rio São Francisco, de onde coletamos um baixo número de amostras, e foram usadas para comparação com as espécies de Serrasalminae das bacias do Amazonas e Orinoco, coletadas no presente estudo.

O banco de dados total consistiu de 1036 sequencias, sendo 98,7% delas (1023) maiores que 500 pares de bases. Nenhuma deleção, inserção ou códon de parada inesperado foi observado nas sequencias, e a composição nucleotídica do banco de dados foi assim definida: A = 22.9%, C = 31%, T = 27.7%, G = 18.4%.

A média de divergência genética variou de 0% a 13% (média de 2.5%) dentro das espécies e de 0% a 11% (média de 2.2%) entre as espécies (Tabela 02).

A análise de Neighbor-Joining mostrou que 57.3% das espécies usadas nesse trabalho formaram grupos monofiléticos, e puderam ser discriminadas corretamente (Figura 02, Tabela 02). No entanto, 29 táxons se mostraram parafiléticos e apresentaram altos valores de divergência intraespecífica. Dentro das 39 espécies e morfotipos que puderam ser discriminados, 10 apresentaram valores de divergência interespecífica menor que 2% (valor de corte adotado aqui para delimitação de espécies). No entanto esses valores ainda permitiram a discriminação entre espécies, uma vez que as mesmas formaram coesivos grupos com haplótipos exclusivos.

Para facilitar o entendimento das análises, mantivemos aqui a divisão da família em três principais grupos, como proposto por ORTÍ et al, 1996: grupo dos pacus, composto pelos gêneros *Colossoma*, *Piaractus* e *Mylossoma*, nesse trabalho chamado de **grupo A**; grupo das piranhas, composto por *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon*, *Pygopristis*, *Catoprion* e *Metynnis*, nesse trabalho chamado **grupo B**; e grupo Myleus, composto pelos gêneros *Myloplus*, *Myleus*, *Mylesinus*, *Ossubtus*, *Utiaritchthys* e *Tometes*, neste trabalho considerado **grupo C**.

Dentro do **grupo A**, apenas *C. macropomum* e *M. aureum* puderam ser discriminados corretamente. *Piaractus brachypomus* apresentou uma linhagem na bacia do rio Orinoco e outra na bacia do Amazonas, enquanto *P. mesopotamicus* formou uma única linhagem junto com *P. brachypomus* do Amazonas. *Mylossoma duriventre* apresentou três linhagens, sendo uma na bacia do Orinoco e duas linhagens na bacia do Amazonas, sendo uma composta de indivíduos de *M.*

duriventre mais *Mylossoma* sp., e outra somente com indivíduos de *M. duriventre* da calha do Solimões-Amazonas e da bacia do rio Madeira (Figura 02).

No **grupo B**, quatro das oito espécies do gênero *Metynnis* foram discriminadas corretamente. No entanto, quatro delas se mostraram parafiléticas apresentando linhagens muito divergentes: *M. hypsauchen* apresentou duas linhagens, sendo uma exclusiva do rio Tocantins e outra abrangendo rios dos Escudos Cristalinos do Brasil Central e Escudo das Guianas. *Metynnis maculatus* também apresentou duas linhagens divergentes: uma delas compreendendo amostras da bacia do rio Orinoco e do alto rio Negro, e outra formada por *M. maculatus* da bacia do Paraná e do rio Itapecuru e por *M. linppicottianus* do São Francisco e *Metynnis* sp. da bacia do rio Jari. Com relação às piranhas desse grupo, as espécies dos gêneros *Pygopristis*, *Catoprion* e *Pygocentrus* foram corretamente discriminadas. Porém, algumas espécies dos gêneros *Pristobrycon* e *Serrasalmus* não. Dentro de *Pristobrycon*, apenas *P. striolatus* foi corretamente discriminada, enquanto que os morfotipos identificados como *Pristobrycon* sp., *Pristobrycon* sp. rio negro e *Pristobrycon* cf. *eigenmanni* ficaram agrupados com espécies do gênero *Serrasalmus*. Das 15 espécies do gênero *Serrasalmus*, apenas quatro puderam ser identificadas corretamente, as outras 11 se mostraram parafiléticas com linhagens muito divergentes, ou com divergência genética muito baixa entre espécies. Esse gênero, a exemplo do grupo *Myleus*, é problemático, sobretudo com respeito à *Serrasalmus rhombeus*, espécie que apresenta uma variação ontogenética muito grande, algumas vezes sendo identificada erroneamente como outra espécie do gênero *Serrasalmus* (MACHADO-ALLISON, 1985). Essa espécie apresentou três linhagens distintas dentro da análise: uma na bacia dos rios Tocantins-Araguaia composta de *S. rhombeus* e *S. gibbus*; uma segunda, restrita a porção alta do rio Xingu, composta apenas por *S. rhombeus*, e uma terceira com maior abrangência na América do Sul, a qual engloba espécimes identificados como *S. gibbus* e *S. maculatus*. *Serrasalmus compressus* da bacia do Madeira e *S. marginatus* da bacia do Paraná formaram um único grupo e assim não puderam ser discriminadas. *Serrasalmus altispinis*, um morfotipo identificado como *Serrasalmus* sp. *robertsoni*, *S. rhombeus* dos rios Jari e Itapecuru, e *S. hastatus* ficaram juntas em um grupo com distancia genética muito baixa entre espécies. Apesar de *S. altispinis* fazer parte desse grupo, seus haplótipos formaram um pequeno subgrupo com uma separação sutil das demais espécies.

O grupo *Myleus*, aqui denominado **grupo C** é historicamente o clado mais complexo dentro de Serrasalminidae uma vez que engloba seis gêneros dos chamados “pacus herbívoros”. Esse grupo foi claramente dividido em dois subgrupos (**C1** e **C2**), porém sem uma separação clara dos gêneros. O grupo **C1** abrigou espécies de *Myloplus*, *Tometes*, *Ossubtus*, *Mylesinus* e *Myleus*, enquanto o grupo **C2** abrigou espécies de *Myloplus*, *Myleus* e *Utiaritchthys*. Embora os gêneros sejam parafiléticos, o DNA barcoding foi capaz de discriminar a maioria das espécies do grupo. Das 27 espécies ou morfotipos analisados, apenas oito não puderam ser discriminadas usando o código de barras do DNA (Figura 02): *Myloplus rubripinnis* que apareceu em oito linhagens diferentes dentro do grupo, sendo cinco delas misturadas com *M. asterias*, *M. lobatus*, *M. sp. guariba* e *Myloplus sp.* Outra espécie que também não pôde ser discriminada foi *M. asterias*, a mesma apareceu em cinco linhagens divergentes: uma composta por *M. asterias*, *M. rubripinnis* e *M. lobatus*; outra composta exclusivamente por *M. asterias* da bacia do rio Tocantins; uma terceira composta por *M. asterias* e *M. rubripinnis* da bacia do rio Tapajós; a quarta linhagem com indivíduos do rio Aripuanã, e uma quinta linhagem composta por *M. asterias* e *Myloplus gr. asterias*. A terceira espécie do grupo *Myleus* que não pode ser discriminada foi *Myloplus lobatus*, a qual apresentou duas linhagens divergentes: uma composta de *M. lobatus*, *M. rubripinnis* e *M. asterias* e outra que envolve *M. lobatus* e *Tometes camunani*. O quarto táxon não discriminado foi um morfotipo identificado apenas como *Myloplus sp.*, o qual se mostrou parafilético aparecendo em cinco linhagens diferentes: dentro da linhagem formada por *Myloplus gr. rubripinnis*, dentro das duas linhagens de *M. rubripinnis* do rio Tapajós, formando uma linhagem dentro da bacia do rio Itapecuru e uma última dentro da linhagem formada por *Myloplus gr. asterias*. *Myloplus schomburgkii* também não foi corretamente discriminado uma vez que apresentou quatro linhagens divergentes. *Tometes camunani* agrupou com *M. lobatus* e assim também não foi possível sua identificação correta, assim como o morfotipo *Myloplus sp. “guariba”*, o qual agrupou com uma linhagem de *M. rubripinnis* do rio Tapajós. As demais 19 espécies e morfotipos dentro desse grupo puderam ser corretamente discriminadas formando grupos monofiléticos.

DISCUSSÃO

A família Serrasalminidae é complexa do ponto de vista taxonômico. Embora não haja mais questionamentos sobre a monofilia dessa família, alguns gêneros ainda permanecem problemáticos. *Myloplus*, *Myleus*, *Mylesinus*, *Tometes*, *Pristobrycon* e a espécie *Serrasalmus rhombeus* são conhecidamente parafiléticos, necessitando assim de uma análise mais profunda para confirmação de seus status taxonômicos. Nas revisões taxonômicas de gêneros dessa família, sinonimizações de espécies são muito comuns, assim como revalidações ou descrições de novos táxons (MACHADO-ALLISON, FINK, ANTONIO, 1989; MERCKX, JÉGU, SANTOS, 2000; JÉGU, HUBERT, BELMONT-JEGU, 2004; ANDRADE, GIARRIZZO, JÉGU, 2013; OTA, 2015; MATEUSSI, 2015). Essa confusão taxonômica persistente nesses táxons de Serrasalminidae pode estar associada à grande diversidade de habitats explorados por esses peixes, à diversidade de hábitos alimentares observados nos membros dessa família, bem como à grande variação ontogenética apresentada por algumas espécies, como por exemplo *S. rhombeus*. A ampla distribuição geográfica de algumas espécies de piranhas, assim como o alto grau de endemismo apresentado por alguns pacus do grupo *Myleus* tornam uma amostragem mais abrangente desses grupos uma tarefa difícil, contribuindo assim para dificuldade na definição do status de muitos táxons dessa família.

Nesse sentido, a utilização isolada de caracteres morfológicos ou caracteres moleculares para descrição de espécies é bastante criticada, sobretudo quando poucos indivíduos por espécie são amostrados (MEYER & PAULAY, 2005), ou quando apenas uma pequena parte da riqueza global das espécies é considerada (BERGSTEN *et al.*, 2012). Nosso trabalho é o primeiro a testar a eficácia do DNA barcoding na identificação de espécies de Serrasalminidae utilizando representantes de todos os gêneros viventes da família. Onze, dos 12 gêneros não monotípicos (Serrasalminidae contém quatro gêneros monotípicos) foram representados por mais de uma espécie, e 92% de todas as espécies utilizadas aqui foram representadas por múltiplos indivíduos. Nossa amostragem promoveu uma cobertura maior das espécies de Serrasalminidae o que nos permitiu uma investigação mais ampla da variação intraespecífica. No entanto, por se tratar de uma família composta de alguns táxons não monofiléticos, baixos valores de divergência interespecífica eram esperados.

O DNA barcoding foi efetivo em discriminar corretamente cerca de 60% das espécies e morfotipos de Serrasalminidae analisados aqui. Esse percentual ficou muito abaixo daquele encontrado por PEREIRA e colaboradores (2013) analisando a ictiofauna da região Neotropical (99.2%); APRIL & MAYDEN (2011), analisando a ictiofauna da América do Norte (90%) e NWANI *et al.* (2011) com peixes do sudeste da Nigéria (99.2%). No entanto ficou muito próximo do percentual encontrado por CASTRO-PAZ e colaboradores (2014) analisando o gênero Neotropical *Hyphessobrycon* (60%) e BENZAQUEM *et al.* (2015) analisando as espécies do gênero *Nannostomus* (57%). De acordo com PEREIRA e colaboradores (2013), os valores de divergência genética tendem a ser mais baixos quanto maior for o número de táxons proximamente relacionados incluídos na análise como, por exemplo, em análises dentro de gêneros ou famílias com grande número de espécies.

Dos 16 gêneros viventes de Serrasalminidae, quatro são monotípicos (possuem uma única espécie), no entanto os gêneros *Serrasalmus*, *Metynnis* e *Myloplus* (*Myleus*) possuem um considerável número de espécies 28, 14 e 15 respectivamente (REIS *et al.*, 2003; OTA, 2015) e, com exceção do gênero *Metynnis*, o qual passou por uma revisão taxonômica recentemente (OTA, 2015), os outros dois gêneros são os mais problemáticos do ponto de vista taxonômico dentro dessa família (THOMPSON *et al.*, 2014) e apresentaram o maior número de táxons com baixa divergência interespecífica. Em contrapartida, dez espécies de Serrasalminidae que foram corretamente discriminadas com o DNA barcoding exibiram valores de divergência intraespecífica acima de 2% apresentando múltiplas linhagens.

Baixa divergência interespecífica em Serrasalminidae

Estudos com peixes utilizando a metodologia do DNA barcoding tem adotado um limiar de corte de 2% de divergência para delimitação das espécies (APRIL & MAYDEN, 2011; DE CARVALHO *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2013; BIRSTEIN *et al.*, 2009; CASTRO PAZ, BATISTA, PORTO, 2014). Esse percentual está baseado nos valores de distribuição das divergências intra e interespecíficas de mais de 188.000 espécimes de peixes, analisados desde a proposição da metodologia (www.boldsystems.org). Embora muitos desses estudos tenham reportado casos de comparações interespecíficas com baixos valores de

divergência (DE CARVALHO *et al.*, 2011; APRIL & MAYDEN, 2011; PEREIRA *et al.*, 2013; BIRSTEIN *et al.*, 2009; CASTRO PAZ, BATISTA, PORTO, 2014; MELO *et al.*, 2016b), ainda assim muitas espécies puderam ser discriminadas corretamente usando adicionalmente outras características das mesmas como sua história evolutiva ou sua distribuição geográfica. Assim, de acordo com PEREIRA *et al.* (2013), o mais razoável seria a utilização desse valor apenas como um ponto de partida para investigação da divergência entre espécies de peixes.

Usando esse limiar de corte para delimitar os táxons de Serrasalminae, 44 espécies e morfotipos analisados aqui apresentaram valores de divergência interespecífica abaixo de 2% e não puderam ser discriminadas baseando-se apenas nesse critério (Tabela 02). Ainda assim, 19 delas apresentaram grupos coesos de haplótipos, e a identificação foi então mantida. As outras 25 espécies e morfotipos com baixa divergência genética compartilharam haplótipos e a discriminação das mesmas não foi possível. Compartilhamento de haplótipos ocorreu principalmente dentro do gênero *Serrasalmus* e do gênero *Myloplus*, porém algumas espécies de *Mylossoma* e *Metynnis* também apresentaram compartilhamento de haplótipos.

Os peixes estão entre os grupos de animais que mais exibem casos de compartilhamento interespecífico de haplótipos. Em peixes de água doce do Canadá, 8% das espécies analisadas por HUBERT *et al.* (2008) compartilharam haplótipos; para os peixes de água doce da América do Norte, esse percentual foi de 10% (APRIL & MAYDEN, 2011), e para os peixes de água doce da Nigéria, 11% (NWANI *et al.*, 2011). Alguns autores como WARD *et al.* (2005), APRIL & MAYDEN (2011) e CASTRO PAZ, BATISTA, PORTO (2014) atribuem esse padrão a possíveis eventos de hibridização, separação incompleta das linhagens (*incomplete lineage sorting*), problemas na taxonomia, até mesmo erros de identificação morfológica das espécies. No caso das espécies de Serrasalminae não existe na literatura relatos de hibridização natural, assim a explicação mais provável para o elevado número de espécies compartilhando haplótipos pode ser a separação incompleta das linhagens devido a recente diversificação desse grupo, sobretudo dentro do gênero *Serrasalmus*, ou problemas na taxonomia das espécies, sobretudo dentro do grupo *Myleus*. HUBERT *et al.* (2007) em uma análise filogeográfica dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* postularam que a separação dos dois táxons ocorreu há cerca de oito milhões de anos com o estabelecimento final do arco do Vaupés, separando as bacias do Orinoco e Amazonas, com subsequente

diversificação dentro desses gêneros, associada com o estabelecimento de outros arcos na América do Sul. Os resultados também mostram que os eventos cladogenéticos mais antigos dentro das piranhas são encontrados nas drenagens mais altas do continente Sul-Americano dentro dos Escudos das Guianas e do Brasil Central, enquanto que as espécies e populações das áreas mais baixas (Planície Amazônica) se originaram mais recentemente nos últimos quatro milhões de anos. MONTOYA-BURGOS (2003) encontraram resultados similares analisando as espécies do gênero *Hypostomus*, com um tempo de divergência e posterior radiação ocorrendo entre 12 e quatro milhões de anos atrás. Nossos resultados são congruentes com as conclusões dos autores acima, *Pygocentrus cariba* aparece, em nossas análises, como grupo irmão de um clado que engloba todas as espécies do gênero *Serrasalmus* e as demais espécies de *Pygocentrus* do Amazonas e São Francisco, corroborando assim uma diversificação recente das espécies desses dois gêneros dentro da bacia Amazônica, (Fig. 2 grupo B).

HUBERT & RENNO (2006), baseados na distribuição dos Characiformes, propõem que as incursões marinhas do Pleistoceno podem ter isolado os peixes nas porções altas do continente Sul-Americano (Escudo das Guianas, Escudo Brasileiro e os Andes) e promovido assim uma maior divergência das linhagens, seguido por episódios de dispersão em direção à planície quando o nível do mar regrediu. Dentro do grupo *Myleus* a maior parte das espécies foi discriminada, porém com baixos valores de divergência genética. Tal fato, associado à nossa amostragem (principalmente nas porções baixas dos tributários do Amazonas), nos leva a concluir que estamos lidando com táxons recém-divergidos de Serrasalminidae.

Dentro das piranhas, existem ainda problemas taxonômicos claros com os gêneros *Serrasalmus* e *Pristobrycon*. Em relação ao gênero *Serrasalmus*, o problema na identificação morfológica das espécies parece estar mais relacionado à variação ontogenética apresentada por algumas espécies desse gênero, (MACHADO-ALLISON & FINK, 1996), bem como a ampla distribuição geográfica de alguns de seus táxons componentes (MACHADO-ALLISON, 1985). THOMPSON *et al.* (2014) analisando as relações filogenéticas de Serrasalminidae, observaram que *S. rhombeus* foi parafilética em todos os três métodos de análise testados e sugeriram que esse táxon é na verdade um complexo de espécies. Os autores ainda consideram que a dificuldade na identificação de *S. rhombeus* está associada a sua ampla

distribuição geográfica e as mudanças ontogenética apresentadas por esse táxon (MACHADO-ALLISON & FINK, 1996).

Das 15 espécies morfológicas de *Serrasalmus* analisadas nesse trabalho, somente quatro foram discriminadas corretamente, com valores de divergência interespecífica em torno dos 2% (*S. manueli*, *S. elongatus*, *S. brandtii* e *S. gouldingi*). As 11 restantes, se resumiram em nove linhagens genéticas com divergência interespecífica abaixo desse percentual. Nossos resultados mostram *S. rhombeus* fazendo parte de três linhagens divergentes dentro da área amostrada e são semelhantes àqueles obtidos por THOMPSON *et al.* (2014), os quais encontram três linhagens divergentes para esse táxon. *Serrasalmus rhombeus*, em nossa análise, foi dividida em uma linhagem restrita ao alto rio Xingu e outra com distribuição em todas as bacias amostradas, a qual englobou também *S. altispinis*, *S. hastatus*, *S. gibbus* e *S. maculatus*. A linhagem do Xingu foi composta somente por indivíduos de *S. rhombeus*, enquanto a outra, com distribuição mais ampla englobou todos os indivíduos identificados como *S. altispinis* e *S. hastatus*, e alguns indivíduos identificados como *S. gibbus* e *S. maculatus*. No entanto, *Serrasalmus altispinis* e *S. hastatus*, mesmo compondo essa grande linhagem de *S. rhombeus*, formaram pequenos grupos de haplótipos exclusivos e apresentaram uma pequena diferenciação genética com a maior parte dos indivíduos de *S. rhombeus*. No caso dos indivíduos de *S. gibbus* e *S. maculatus*, trata-se claramente de erro na identificação dos mesmos, uma vez que linhagens bem definidas desses dois táxons também são discriminadas aqui. Observamos ainda indivíduos de *S. rhombeus* provenientes da bacia do Tocantins-Araguaia compondo uma linhagem com *S. gibbus*, endêmica da bacia do rio Tocantins (JEGU & DOS SANTOS, 1988). Embora as duas espécies ocorram em simpatria nessa bacia, consideramos que essa linhagem seja composta somente por *S. gibbus*, e que os indivíduos nela identificados como *S. rhombeus* são na verdade *S. gibbus*.

Para outras espécies de *Serrasalmus* os resultados foram confusos. As duas linhagens de *S. serrulatus* abrigam também espécimes identificados como *S. eigenmanni*, *S. spilopleura* e *Pristobrycon sp.*, algumas vezes se resumindo em um único haplótipo, o mesmo sendo observado na linhagem de *S. spilopleura*, a qual embora mais divergente também congrega indivíduos de *S. eigenmanni* e *Pristobrycon sp.* No trabalho de HUBERT *et al.* (2007), esses táxons também agrupam em um clado com baixa distancia genética, no entanto este ainda foi

subdividido em dois clados bem suportados, um agrupando *Pristobrycon calmoni* e *S. serrulatus* e o outro juntando *S. spilopleura*, *S. eigenmanni* e *S. gouldingi*, esta última sendo discriminada corretamente em nossa análise.

Com relação à *Pristobrycon*, em todas as análises filogenéticas de Serrasalmidae, algumas espécies desse gênero ficam agrupadas com espécies do gênero *Serrasalmus*, se mostrando mais relacionadas com este (MACHADO-ALLISON, FINK, ANTONIO, 1989; ORTÍ *et al.*, 1996, ORTÍ *et al.*, 2008; CIONE *et al.*, 2009; THOMPSON *et al.*, 2014). Apenas *P. striolatus* aparece como um grupo separado e, na maioria das vezes, mais relacionado com *Pygopristis* e *Catoprion*. Em nossa análise, a maior parte dos indivíduos identificados como *Pristobrycon striolatus* ficaram agrupadas em um clado mais relacionado com *Pygopristis denticulata* e *Catoprion mento*, as quais foram corretamente discriminadas. Os demais indivíduos de *Pristobrycon* (*Pristobrycon* sp. e *Pristobrycon* sp. rio negro) agruparam ou com *Serrasalmus serrulatus* ou com *S. spilopleura*. Esse padrão de relacionamento das espécies de *Pristobrycon* já vem sendo observado desde os trabalhos de MACHADO-ALLISON em 1985, em um estudo sobre o status genérico e as relações filogenéticas dos gêneros *Pygopristis*, *Pristobrycon*, *Pygocentrus* e *Serrasalmus*. Nesse estudo o autor observa o compartilhamento de alguns caracteres apomórficos que indicariam uma relação filogenética muito próxima entre *Serrasalmus* e *Pristobrycon*. Trabalhos posteriores, incluindo mais espécies de *Pristobrycon*, como aquele realizado por ORTÍ e colaboradores em 1996, confirmam os resultados de MACHADO-ALLISON (1985) e mostram *P. calmoni* agrupada com espécies do gênero *Serrasalmus* e *P. striolatus*, formando um grupo separado mais relacionado com *Pygopristis*. Recentemente, THOMPSON e colaboradores em 2014, em sua filogenia multilocus das piranhas e pacus, encontraram a mesma relação entre *Pristobrycon* e *Serrasalmus* observada anteriormente. ORTÍ *et al.* (2008) sugerem que somente *P. striolatus* faça parte do gênero *Pristobrycon* e que as demais espécies sejam remanejadas para *Serrasalmus*. Embora em 2004, JÉGU considere *P. calmoni* (espécie tipo de *Pristobrycon*), como pertencente a *Serrasalmus*, e ORTÍ *et al.* (2008) restrinjam *Pristobrycon* a uma única espécie (*P. striolatus*), até o momento não foi realizada uma revisão taxonômica para definição do status genérico das espécies de *Pristobrycon*.

Apesar de todos os problemas já citados anteriormente para os dois gêneros, nossa análise mostra uma separação congruente da maioria das espécies de *Serrasalmus* e *Pristobrycon*.

A mesma situação de compartilhamento de haplótipos ocorreu entre algumas espécies dos gêneros *Myloplus* e *Tometes* (Fig. 2 grupo C). Esses gêneros também fazem parte do grupo *Myleus*, o qual engloba ainda *Mylesinus*, *Myleus*, *Ossubtus* e *Utariitichthys*, outros gêneros parafiléticos de pacus. As relações das espécies dentro desse grande grupo de Serrasalmidae são confusas, porém a maior parte delas foi corretamente discriminada pelo DNA barcoding em nossas análises. Apenas as espécies *Myloplus rubripinnis*, *M. asterias*, *M. lobatus*, *Tometes camunani* e um morfotipo identificado como *Myloplus* gr. *asterias* compartilharam haplótipos e a separação das mesmas não foi possível. *Myloplus rubripinnis*, *M. asterias* e *M. lobatus* formaram vários subgrupos mistos muito próximos entre si e mais relacionados com *Myleus micans*, espécie descrita para a bacia do rio São Francisco. No entanto, a situação mais complexa evidenciada em nossa análise dentro do grupo *Myleus*, foi a junção de *Tometes camunani* com a maior parte dos espécimes identificados como *Myloplus lobatus*, formando uma única linhagem. *Tometes* diferencia-se dos demais gêneros do grupo *Myleus*, sobretudo pela morfologia dos dentes, no entanto, desde sua descrição em 1850 por Valenciennes, as espécies do gênero (*T. trilobatus* e *T. unilobatus*) ficaram em sinonímia com espécies de *Myleus* com quem compartilham dentes incisiformes, até 2002, quando JÉGU *et al.* (2002) reconheceram *T. trilobatus* como a espécie-tipo do gênero, reabilitando *Tometes*. *Tometes camunani* foi descrito recentemente (ANDRADE, GIARRIZZO, JÉGU, 2013) como uma espécie de Serrasalmidae reofílica, endêmica da bacia do rio Trombetas. *Myloplus lobatus*, no entanto, tem uma ampla distribuição nas bacias do Amazonas e Orinoco (JÉGU, 2003), o que nos leva a concluir que os espécimes identificados como *T. camunani* são na verdade *M. lobatus*. Quatro espécimes identificados como *M. lobatus* aparecem ainda em outros clados junto com *M. rubripinnis* e *M. asterias*, o que, no entanto, pode se tratar de erro de identificação desses espécimes, uma vez que a grande maioria deles formou um clado bastante conciso junto com os quatro espécimes de *T. camunani*.

Desde as primeiras tentativas de classificação dos táxons de Serrasalmidae (MACHADO-ALLISON, 1983), os gêneros componentes do grupo *Myleus* se mostraram problemáticos. No trabalho de MACHADO-ALLISON de 1983, apenas

três gêneros pertencentes a este grupo foram analisados morfologicamente e, mesmo considerando *Mylesinus* e *Utiaritchthys* como gêneros válidos, o autor sugere que estes poderiam ser formas especializadas de *Myleus*, um gênero que já se mostrava parafilético. Em 2014, THOMPSON e colaboradores propõem uma filogenia multilocus para os Serrasalmidae e da mesma forma, os três gêneros desse grupo incluídos na análise (*Myloplus*, *Tometes* e *Mylesinus*) se mostraram parafiléticos. Apesar de algumas revisões taxonômicas dentro desse grupo (JÉGU & SANTOS, 2002; JÉGU *et al.*, 2002; JÉGU, HUBERT, BELMONT-JEGU, 2004; ANDRADE, GIARRIZZO, JÉGU, 2013), as relações entre a maioria dos táxons continua problemática. Apesar de todas essas incertezas com relação ao grupo *Myleus*, muitas espécies e gêneros dentro desse grupo vêm sendo descritas (JEGU, TITO DE MORAIS, SANTOS, 1992; JÉGU & KEITH, 2002; JÉGU, MENDES DOS SANTOS, BELMONT-JÉGU, 2002; ANDRADE, GIARRIZZO, JÉGU, 2013; ANDRADE, JÉGU, GIARRIZZO, 2016; PEREIRA & CASTRO, 2014).

Serrasalmidae com divergência intraespecífica maior que 2%

A descoberta de espécies crípticas e a sinalização de novas espécies de peixes através de análises utilizando o DNA barcoding tem aumentado nosso conhecimento sobre a biodiversidade em diversos táxons e, em muitos casos, melhorado a compreensão das relações entre estes, o que tem tornado o uso dessa ferramenta para esse fim, uma realidade (WARD *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2013; APRIL & MAYDEN, 2011; MELO *et al.*, 2016b; CASTRO PAZ, BATISTA, PORTO, 2014).

Entre as 66 espécies e morfotipos de piranha e pacu utilizados em nossa pesquisa, nove (13%) apresentaram valores de divergência intraespecífica acima de 2% (*Mylesinus paraschomburgkii* (2,8%), *Myleus setiger* (2,2%), *Myloplus schomburgkii* (9,2%), *M. arnoldi* (9,1%), *M. rhomboidalis* (2,3%), *Mylossoma aureum* (5,6%), *Piaractus brachypomus* (3,3%), *Metynnis luna* (3,4%), e *Pygocentrus nattereri* (2,1%)) (Fig. 2 Tabela 2) e foram subdivididas em dois ou mais grupos. Valores altos de divergência intraespecífica têm sido registrados em análises com DNA barcoding e tem revelado a ocorrência de diversidade críptica em vários táxons de peixes. PEREIRA e colaboradores em 2013, analisando peixes de

água doce Neotropicais, encontraram espécies com divergência intraespecífica variando de 1,4% a 8%, enquanto para peixes de água doce da América do Norte, APRIL *et al.* (2011) encontraram espécies com até 15% de divergência intraespecífica. CASTRO-PAZ e colaboradores em 2014, analisando as espécies do gênero *Hyphessobrycon* na Amazônia encontraram divergência intraespecífica variando de 3,6% a 22,2%, o mesmo sendo observado em algumas espécies do gênero *Curimatopsis* (MELO *et al.* 2016), as quais apresentaram valores de divergência dentro das espécies variando de 4,6% a 20,4%. A limitada capacidade de dispersão dos peixes de água doce, em comparação com peixes marinhos, pode promover linhagens divergentes e aumentar as taxas de especiação, sobretudo em táxons com algum tipo de adaptação (HELFMAN *et al.* 2009). Embora os valores encontrados aqui sejam relativamente mais baixos que aqueles encontrados nos trabalhos anteriores (2,1% a 9,2%), esses táxons são considerados espécies crípticas, uma vez que boa parte deles apresentou linhagens com distribuição alopátrica, o que reforça uma historia evolutiva independente para as mesmas, não corroborando assim um simples padrão de variação genética dentro de uma grande população (AVISE, 2000). Das nove espécies de Serrasalminidae com divergência intraespecífica maior que 2%, cinco fazem parte do grande grupo *Myleus*, o qual abriga várias espécies de pacus reofilicos, algumas das quais consideradas endêmicas de áreas de corredeiras e cachoeiras, e que exibem adaptações tróficas e comportamentais para a vida nesses ambientes (ANDRADE, JÉGU, GIARRIZZO, 2016; PEREIRA & CASTRO, 2014; PORTO, 1999; SANTOS, *et al.*, 1997). A maior parte das espécies com divergência intraespecífica alta apresentou valores de distância genética muito próximos ao limite de corte de 2% adotado aqui. No entanto, algumas espécies exibiram linhagens muito divergentes, com valores de distância genética acima dos 3%. *Myloplus schomburgkii* e *M. arnoldi* foram os táxons que apresentaram os valores mais altos, com linhagens separadas principalmente pelo rio Amazonas (Fig. 02, grupo C2). No entanto, *M. schomburgkii* apresentou uma subdivisão na linhagem do escudo das Guianas e duas linhagens no escudo Brasileiro. A linhagem do escudo das Guianas englobou as amostras dos rios Branco, Negro e Nhamundá, porém um indivíduo proveniente do rio Água Boa do Univini, afluente da margem direita do rio Branco, formou uma linhagem separada com distancia genética de 9,5%. Para o escudo Brasileiro, uma linhagem foi composta de indivíduos proveniente dos rios Araguaia, Tapajós e baixo Xingu e a outra, composta somente por indivíduos do alto

Xingu, a qual foi mais próxima de *Tometes makue* e divergiu dos outros clados de *M. schomburgkii* em 11,7% (Tabela 2). Embora essa espécie seja de fácil identificação morfológica, não podemos certificar a identificação dos espécimes do alto Xingu e do rio Água Boa, uma vez que os mesmos não foram conferidos por especialistas no grupo. No entanto, podemos afirmar que são Serrasalminidae, muito provavelmente erroneamente identificados como *M. schomburgkii*.

Myloplus arnoldi também é fácil de identificar morfológicamente e apresentou divergência muito alta entre as linhagens (9,1%), sendo maior que a distancia entre alguns gêneros de Serrasalminidae (Tabela 2). Porém, as duas linhagens são monofiléticas e a distribuição das mesmas condiz com a distribuição da espécie (rio Amazonas e rios do escudo Brasileiro) (JÉGU, 2003), além do fato de nossa amostragem no escudo das Guianas ter sido realizada na porção baixa do rio Nhamundá, ou seja, dentro da área de ocorrência da espécie. Embora os pacus do grupo *Myleus* sejam táxons antigos dentro de Serrasalminidae, todos os trabalhos que tem tentado definir as relações entre os gêneros e espécies desse grupo, não têm sido conclusivos (ORTÍ *et al.*, 1996; ORTÍ *et al.*, 2008; THOMPSON *et al.*, 2014). Portanto, com base no exposto acima, consideramos as linhagens de *M. arnoldi*, espécies candidatas não confirmadas (PADIAL *et al.*, 2010).

Piaractus brachypomus (3,3% de divergência intraespecífica) e *Mylossoma aureum* (5,6%) também apresentaram linhagens alopátricas, cada espécie com uma linhagem na bacia do Orinoco e outra na bacia do Amazonas (Fig. 02, grupo A). ESCOBAR *et al.* (2015) analisando caracteres morfológicos e moleculares de *P. brachypomus* das duas bacias, concluíram que esta espécie forma unidades evolutivas independentes no Amazonas e Orinoco. Quanto a *Mylossoma aureum*, em uma recente revisão taxonômica do gênero, MATEUSSI (2015) considera quatro espécies para esse grupo: *M. unimaculatum*, com distribuição exclusiva nas bacias dos rios Tocantins e Araguaia; *M. duriventre*, agora restrita às bacias do Paraguai, baixo Paraná e Uruguai; *M. albiscopum*, com distribuição nas bacias do Amazonas e Orinoco; e *M. aureum*, também com distribuição nessas duas bacias. *Mylossoma aureum*, em nossas análises, apresenta o mesmo padrão de distribuição de *P. brachypomus* para as bacias do Orinoco e Amazonas, inclusive com valores de divergência intraespecífica semelhantes. Entretanto, nossa análise baseada em apenas um marcador molecular, não nos permite considerar as linhagens dentro de *M. aureum* como unidades evolutivas significantes em cada bacia, a exemplo de *P.*

brachypomus. Ainda de acordo com MATEUSSI (2015), *M. aureum* é facilmente distinguível de sua congênere simpátrica (*M. albiscopum*), e não apresenta diferenças morfológicas dentro da espécie nas duas bacias.

Pygocentrus nattereri foi a espécie que apresentou o maior número de linhagens intraespecífica, no entanto com os mais baixos valores de divergência (2,1%). As três linhagens não apresentam um padrão definido de distribuição (Fig. 2 grupo B), sendo uma composta de indivíduos provenientes da bacia do rio Guaporé, outra distribuída nos rios Araguaia, São Bento e Itapecuru (os dois últimos no Maranhão), e a terceira ocorrendo principalmente na bacia Amazônica, porém com alguns indivíduos do rio Itapecuru compondo essa linhagem (Fig. 02). HUBERT e colaboradores em 2007, já haviam observado essa diversidade críptica dentro de *Pygocentrus*, com valores de divergência intraespecífica variando de 1,2% a 3%, muito próximos dos valores encontrados em nossa pesquisa. Em uma análise filogeográfica das espécies desse gênero e do gênero *Serrasalmus*, eles encontraram uma forte associação do processo de diversificação de *P. nattereri* na América do Sul com o padrão de estabelecimento das principais bacias de drenagens no continente (Amazonas, Paraná, Ucayali e Madeira). Nossos resultados apresentaram padrão similar de distribuição das linhagens de *P. nattereri* àquele obtido pelos autores acima, diferenciando apenas com relação à linhagem da bacia do rio Paraná, a qual não foi amostrada em nosso trabalho.

Nossa pesquisa com representantes de todos os gêneros da família Serrasalminidae revelou uma significativa quantidade de diversidade críptica não reconhecida previamente. Comparando nossos resultados com outros que revelaram diversidade críptica dentro de espécies de peixes analisadas com DNA barcoding, nós concluímos que nosso estudo aumentou ou identificou 19 novos táxons de Serrasalminidae.

Ausência de divergência interespecífica e espécies distintas que podem ser uma só

Nossa análise dos membros da família Serrasalminidae revelou divergentes padrões de variação genética. Alguns táxons apresentaram baixa divergência interespecífica, outros, alta diversidade críptica, até táxons distintos formando um simples agrupamento genético e, provavelmente, uma simples linhagem evolutiva foram encontrados em nossos resultados. Esta última situação foi observada entre

Piaractus brachypomus (linhagem do Amazonas) e *P. mesopotamicus* espécie descrita para a bacia do Paraná-Paraguai (Fig. 2, grupo A), e entre *Myloplus lobatus*, descrita para as bacias do Amazonas e Orinoco (VALENCIENNES, 1850) e *Tometes camunani*, descrita para porção alta do rio Trombetas (ANDRADE, GIARRIZZO, JÉGU, 2013) (Fig. 02, grupo C1). Nossa análise com *Piaractus* foi baseada em 13 sequências de *P. brachypomus*, sendo seis do Orinoco e sete do Amazonas, e 26 de *P. mesopotamicus*, sendo cinco provenientes do rio São Francisco e 21 da bacia do Paraná. Os resultados mostraram o mesmo resultado encontrado por ESCOBAR e colaboradores em 2015 com *P. brachypomus* dividida em duas linhagens bem divergentes, uma na bacia do rio Orinoco e outra restrita a bacia do Amazonas, a qual formou uma única linhagem com *P. mesopotamicus*, descrita para a bacia do Paraná-Paraguai. ORTÍ *et al.* 2008 também já haviam obtido resultados semelhantes, no entanto os autores não utilizaram amostras de *P. brachypomus* da bacia do Orinoco, observando assim somente a ausência de divergência interespecífica entre as duas espécies de *Piaractus* do Amazonas e Paraná-Paraguai. Ambos os autores não comentam sobre a junção de *P. brachypomus* e *P. mesopotamicus* formando uma única linhagem evolutiva, no entanto nossos resultados com COI mostram uma divergência intraespecífica de 3,2% em *P. brachypomus* e de 1,1% em *P. mesopotamicus*, o que reforça a subdivisão da primeira em duas linhagens distintas (Orinoco e Amazonas) e corrobora uma única linhagem formada por *P. brachypomus* (linhagem Amazonas) e *P. mesopotamicus* para o Amazonas e Paraná-Paraguai, uma vez que a divergência interespecífica foi zero. Conjuntamente, os resultados suportam duas espécies para o gênero *Piaractus*, uma restrita a bacia do rio Orinoco e a outra com ampla distribuição nas bacias do Amazonas, Paraná-Paraguai e São Francisco. Uma revisão do gênero para definição de suas espécies componentes bem como sua distribuição é necessária, uma vez que esses peixes constituem um importante recurso econômico para a América do Sul, sendo importante tanto para as pescarias como para aquicultura.

Tometes camunani e *Myloplus lobatus* também não apresentaram divergência interespecífica e formaram uma única linhagem. Nossa análise utilizou quatro amostras de *T. camunani* e 36 de *M. lobatus* as quais representaram 12 haplótipos. *Myloplus lobatus* foi parafilético apresentando duas linhagens divergentes, uma junto com vários indivíduos identificados como *M. rubripinnis* e mais relacionada com um grupo de *M. asterias* (Fig. 2 grupo C2) e outro grupo de *M.*

rubripinnis do rio Tapajós, e uma segunda linhagem que envolve a maior parte dos indivíduos identificados como *M. lobatus* e todos os quatro indivíduos de *T. camunani* (Fig. 2 grupo C2). O grupo *Myleus* (*Myleus*, *Ossubtus*, *Tometes*, *Utiritichthys*, *Mylesinus* e *Myloplus*) é historicamente um grupo problemático, com as relações entre os gêneros ainda não bem definidas (MACHADO-ALLISON, 1983; ORTÍ *et al.* 1996; ORTÍ *et al.* 2008; THOMPSON *et al.* 2014). No entanto, embora os gêneros se mostrem parafiléticos ao longo dos estudos filogenéticos, a maioria das espécies dentro do grupo *Myleus* foi corretamente discriminada pelo DNA barcoding em nossa análise; das 26 espécies e morfotipos, 18 foram corretamente identificadas e confirmadas. As quatro sequências de *T. camunani*, juntamente com as cinco de *M. lobatus* do rio Trombetas se resumiram em um único haplótipo. Por causa da distribuição simpátrica das duas espécies e a total ausência de divergência entre as mesmas, a explicação mais provável para esse fato seria erro na identificação das espécies. Erro na descrição de *T. camunani* ou erro na identificação dos espécimes atribuídos a essa espécie e que foram utilizados aqui. Embora *M. lobatus* não tenha sido comparado na descrição de *T. camunani*, a segunda opção parece a mais razoável, uma vez que este último táxon é descrito para as porções altas do rio Trombetas, ao passo que *M. lobatus*, originalmente foi descrito para o rio Amazonas. No entanto, os indivíduos provenientes do rio Trombetas, identificados como *M. lobatus*, foram coletados na bacia do rio Erepecuru, afluente da margem esquerda do rio Trombetas, o qual também faz parte da área de ocorrência de *T. camunani*. Não descartamos a possibilidade de *T. camunani* ser na verdade uma subpopulação de *M. lobatus* da bacia do rio Trombetas, no entanto, consideramos aqui erro na identificação dos espécimes atribuídos a *T. camunani*, uma vez que apenas quatro espécimes identificados como *M. lobatus* agruparam com outras espécies de *Myloplus*. Enfatizamos novamente a necessidade de uma revisão envolvendo todas as espécies do grupo *Myleus*, para que se possa definir, ou pelo menos clarear, as relações entre os gêneros, pois apesar do grupo formado por *M. lobatus* e *T. camunani* possuir mais indivíduos do primeiro táxon, o mesmo se mostrou mais relacionado com outras espécies de *Tometes*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No geral essa primeira análise da família Serrasalminidae com DNA barcoding, confirma os resultados mais gerais das várias análises já realizadas na tentativa de elucidar as relações desse grupo de peixes Neotropicais. Entre outros, nossa análise mantém a divisão da família em três grandes clados (Pacu, grupo *Myleus* e Piranha), com o gênero *Acnodon* como grupo irmão do clado *Myleus*, como já havia sido proposto por ORTÍ *et al.* (1996); confirma a parafilia dos gêneros *Serrasalmus* e *Pristobrycon*, mostrando *P. striolatus* mais relacionada com *Pygopristis* e *Catoprion* e as demais espécies desse gênero agrupando com *Serrasalmus*, como já observado por MACHADO-ALLISON (1985), assim como a parafilia da maior parte dos gêneros do grupo *Myleus*, com persistência da indefinição do status genérico de muitas espécies desse grupo, como já mencionado por JÉGU & SANTOS, (2002).

Embora o DNA barcoding tenha discriminado corretamente pouco mais de 50% das espécies e morfotipos analisados aqui, consideramos a metodologia uma importante ferramenta para auxiliar a taxonomia na identificação da megadiversa fauna de peixes da região Neotropical. Esse baixo percentual, nós atribuímos principalmente, ao compartilhamento interespecífico de haplótipos observado entre boa parte dos táxons dessa família, sobretudo, dentro do grupo *Myleus* e entre algumas espécies de *Serrasalmus*, como resultado de um processo recente de diversificação desses peixes na América do Sul.

Nossa análise também revelou diversidade críptica em vários táxons dentro dos três clados de Serrasalminidae (grupos A, B e C), alguns com linhagens tão divergentes que podem ser consideradas espécies candidatas, sobre as quais sugerimos uma abordagem integrativa para definição e confirmação de seus status taxonômicos. Nos referimos aqui às espécies *Mylesinus paraschomburgkii*, *Myleus setiger*, *Myloplus schomburgkii*, *M. arnoldi*, *M. rhomboidalis*, *Mylossoma aureum*, *Piaractus brachypomus*, *Metynnis luna*, e *Pygocentrus nattereri*.

Como pode ser observado, a maior parte da diversidade críptica ocorreu dentro das espécies do grupo *Myleus*, o clado de Serrasalminidae com maiores incertezas taxonômicas até então.

Tabela 1. Lista de espécies e morfotipos de Serrasalmídeos utilizados, linhagens moleculares apresentadas e suas respectivas áreas de distribuição (bacias de drenagens). (-) ausência de linhagens

Gênero	Espécie/Morfotipo	Linhagens	Bacia hidrográfica
<i>Colossoma</i>	<i>C. macropomum</i>	1	Orinoco/Amazonas
<i>Piaractus</i>	<i>P. brachypomus</i>	2	Orinoco e Amazonas
	<i>P. mesopotamicus</i>	-	Amazonas/Paraná/São Francisco
<i>Mylossoma</i>	<i>M. aureum</i>	2	Orinoco e Amazonas
	<i>M. duriventre</i>	3	Orinoco e Amazonas
	<i>M. sp. "Orinoco"</i>	1	Orinoco
	<i>Mylossoma sp.</i>	-	
	<i>M. planquetei</i>	1	Jari
	<i>M. torquatus</i>	1	Escudo Brasileiro (Aripuanã, Tapajós, Xingu, Araguaia)
	<i>M. lobatus</i>	1	Escudo Brasileiro, Guianas e Japurá
	<i>M. schomburgkii</i>	4	Escudo Brasileiro e das Guianas
	<i>M. rhomboidalis</i>	3	Escudo das Guianas (Branco e Jari), Xingu
<i>Myloplus</i>	<i>M. arnoldi</i>	2	Nhamundá e Escudo Brasileiro
	<i>M. rubripinnis</i>	4	Escudo Brasileiro e das Guianas
	<i>M. aff. rubripinnis</i>	1	Xingu
	<i>M. gr. rubripinnis</i>	1	Aripuanã
	<i>M. asterias</i>	2	Tocantins e Aripuanã
	<i>M. gr. Asterias</i>	1	Escudo Brasileiro, das Guianas e Madeira
	<i>M. sp. rio Negro</i>	1	Rio negro
	<i>Myloplus sp.</i>	1	Itapecuru-MA
	<i>M. sp. "guariba"</i>	-	Tapajós
	<i>Myloplus sp. TLP</i>	-	Tapajós
<i>Myleus</i>	<i>M. setiger</i>	3	Escudo Brasileiro e das Guianas
	<i>M. micans</i>	1	São Francisco

	<i>M. hypsauchen</i>	2	Escudo Brasileiro e das Guianas
	<i>M. maculatus</i>	2	Alto Orinoco e Alto rio Negro; Paraná e Maranhão
	<i>M. altidorsalis</i>	1	Escudo Brasileiro e das Guianas
<i>Metynnis</i>	<i>M. polystictus</i>	1	Xingu
	<i>M. lippincottianus</i>	-	-
	<i>M. luna</i>	2	Escudo Brasileiro e das Guianas
	<i>Metynnis sp. n</i>	2	Rio negro; Trombetas
	<i>Metynnis sp.</i>	-	Jari
	<i>M. paraschomburgkii</i>	3	Jari; Trombetas; Uatumã
<i>Mylesinus</i>	<i>M. paucisquamatus</i>	1	Tocantins-Araguaia
<i>Ossubtus</i>	<i>O. xinguense</i>	1	Xingu
	<i>T. makue</i>	1	Rio Negro
	<i>T. lebaili</i>	1	Maroni
	<i>T. trilobatus</i>	1	Jari
<i>Tometes</i>	<i>T. camunani</i>	-	Trombetas
	<i>T. ancylorhynchus</i>	1	Tocantins-Araguaia
	<i>T. kranponhah</i>	1	Xingu
	<i>T. sp. n</i>	1	Tocantins-Araguaia e tapajós
<i>Utiaritichthys</i>	<i>U. longidorsalis</i>	1	Aripuanã
	<i>A. normani</i>	1	Xingu
<i>Acnodon</i>	<i>A. SENAI</i>	1	Jari
<i>Catoprion</i>	<i>C. mento</i>	1	Escudo Brasileiro e das Guianas
<i>Pygopristis</i>	<i>P. denticulata</i>	1	Escudo Brasileiro e das Guianas
	<i>P. striolatus</i>	1	Escudo Brasileiro e das Guianas
<i>Pristobrycon</i>	<i>P. sp. "rio negro"</i>	-	Rio Negro
	<i>Pristobrycon sp.</i>	-	Branco
	<i>P. Cariba</i>	1	Orinoco
<i>Pygocentrus</i>	<i>P. nattereri</i>	3	Guaporé/Madeira; Araguaia/Maranhão; Amazonas/Maranhão

	<i>P. piraya</i>	1	São Francisco
	<i>S. elongatus</i>	1	Amazonas
	<i>S. manueli</i>	1	Escudo Brasileiro e das guianas
	<i>S. rhombeus</i>	2	Xingu; Orinoco/Amazonas
	<i>S. compressus</i>	1	Aripuanã/Nhamundá
	<i>S. marginatus</i>	1	Paraná
	<i>S. altispinis</i>	1	Escudo Brasileiro e das Guianas
	<i>S. hastatus</i>	1	Branco
<i>Serrasalmus</i>	<i>S. sp. "robertsoni"</i>	-	Madeira
	<i>S. gibbus</i>	1	Tocantins-Araguaia
	<i>S. maculatus</i>	1	Paraná e Madeira
	<i>S. serrulatus</i>	1	Amazonas
	<i>S. eigenmanni</i>	-	Amazonas
	<i>S. brandtii</i>	1	São Francisco
	<i>S. spilopleura</i>	1	Amazonas
	<i>S. gouldingi</i>	1	Escudo das Guianas e Madeira

Tabela 2. Valores de distância genética dentro e entre as espécies e morfotipos de Serrasalmídeos

Espécies/Morfotipo	Divergência genética		
	Máx. intra	Média intra	Min. inter
<i>Serrasalmus gouldingi</i>	0,006837	0,004801	0,019097
<i>Serrasalmus spilopleura</i>	0,051693	0,048904	0
<i>Serrasalmus eigenmanni</i>	0,036821	0,031781	0
<i>Serrasalmus serrulatus</i>	0,016129	0,014345	0
<i>Serrasalmus brandtii</i>	0,001727	0,001684	0
<i>Serrasalmus maculatus</i>	0,042692	0,041319	0
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	0,023217	0,020846	0
<i>Serrasalmus gibbus</i>	0,022988	0,022331	0
<i>Serrasalmus sp. "robertsoni"</i>	0	0	0
<i>Serrasalmus hastatus</i>	0	0	0
<i>Serrasalmus compressus</i>	0,023529	0,020915	0
<i>Serrasalmus altispinis</i>	0,003508	0,002753	0
<i>Serrasalmus marginatus</i>	0,005328	0,004083	0,006504
<i>Serrasalmus manueli</i>	0,013182	0,010780	0,017341
<i>Serrasalmus elongatus</i>	0,010256	0,010115	0,018292
<i>Pristobrycon sp. rio negro</i>	0,035842	0,034554	0
<i>Pristobrycon striolatus</i>	0,123809	0,121724	0
<i>Pygocentrus nattereri</i>	0,020725	0,016860	0,013035
<i>Pygocentrus piraya</i>	0,005226	0,004248	0,013035
<i>Pygocentrus Cariba</i>	0,003584	0,003570	0,038535
<i>Catoprion mento</i>	0,018939	0,014790	0,093681
<i>Pygopristis denticulata</i>	0,001851	0,001799	0,102396
<i>Metynniss sp.n</i>	0,016393	0,014720	0
<i>Metynniss luna</i>	0,033333	0,032681	0,059447
<i>Metynniss maculatus</i>	0,117967	0,111978	0

<i>Metynnis lippincottianus</i>	0	0	0
<i>Metynnis sp.</i>	0,003663	0,003663	0
<i>Metynnis polystictus</i>	0,003745	0,003745	0,043071
<i>Metynnis hypsauchen</i>	0,106741	0,102499	0,015544
<i>Metynnis altidorsalis</i>	0,003809	0,003463	0,017271
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	0,011608	0,009793	0
<i>Piaractus brachypomus</i>	0,032986	0,031483	0
<i>Colossoma macropomum</i>	0,010582	0,007902	0,114583
<i>Mylossoma duriventre</i>	0,078651	0,066186	0
<i>Mylossoma sp.</i>	0,005494	0,004662	0
<i>Mylossoma sp. Orinoco</i>	0,003787	0,003242	0,049019
<i>Mylossoma aureum</i>	0,059459	0,055785	0,052208
<i>Myloplus gr. Asterias</i>	0,010416	0,006221	0
<i>Myloplus sp.</i>	0,106732	0,103661	0
<i>Myloplus asterias</i>	0,063752	0,060157	0
<i>Myloplus rubripinnis</i>	0,059964	0,056244	0
<i>Myloplus aff. rubripinnis</i>	0,003300	0,002477	0,019704
<i>Myloplus gr. Rubripinnis</i>	0,004950	0,003839	0
<i>Myloplus lobatus</i>	0,100378	0,093924	0
<i>Myloplus sp. guariba</i>	0	0	0
<i>Myloplus arnoldi</i>	0,086705	0,084228	0,096405
<i>Myloplus rhomboidalis</i>	0,023060	0,020571	0
<i>Myloplus schomburgkii</i>	0,133333	0,111071	0
<i>Myloplus sp. rio negro</i>	0	0	0,022522
<i>Myloplus torquatus</i>	0,032520	0,030474	0,033840
<i>Myloplus planquettei</i>	0	0	0,033840
<i>Myleus micans</i>	0,004878	0,003958	0,082474
<i>Myleus setiger</i>	0,021696	0,016366	0
<i>Utiaritchthys longidorsalis</i>	0,001650	0,001643	0,021138

<i>Mylesinus paucisquamatus</i>	0,008130	0,007804	0,040849
<i>Mylesinus paraschomburgkii</i>	0,028248	0,024700	0,047154
<i>Tometes ancylorhynchus</i>	0,006734	0,004796	0,032520
<i>Tometes kranponhah</i>	0,003252	0,002212	0,032520
<i>Tometes camunani</i>	0	0	0
<i>Tometes sp.</i>	0,012411	0,009479	0,013961
<i>Tometes trilobatus</i>	0	0	0,013961
<i>Tometes makue</i>	0	0	0,073170
<i>Tometes lebaili</i>	0,001626	0,001626	0,068292
<i>Ossubtus xinguense</i>	0,005263	0,004381	0,091358
<i>Acnodon normani</i>	0,006633	0,006633	0,010810
<i>Acnodon SENAI</i>	0	0	0,010810

CAPITULO II

FILOGEOGRAFIA COMPARADA DE PACUS E PIRANHAS NA AMAZÔNIA

Valéria Machado

Orientador: Dr. Tomas Hrbek

Co-orientador: Dr. Rupert Collins

Manaus/2016

RESUMO

A ictiofauna neotropical iniciou sua diversificação na Gondwana e, atualmente são reconhecidas 43 famílias de peixes de água doce endêmicas desta região, entre elas a família Serrasalminidae, a qual é amplamente distribuída na América do Sul. Esse grande número de famílias de peixes é provavelmente um reflexo da história paleohidrológica e da diversificação de habitat ocorridos nos últimos 110 milhões de anos de isolamento com a África. Várias hipóteses, baseadas em diferentes processos, têm sido propostas para explicar a origem e o padrão (ou os padrões) de distribuição dessa grande diversidade ictiofaunística. Entender esses processos permite inferir modelos hierárquicos de diferenciação genética e de estrutura filogeográfica que reflitam a história geográfica da região. Para contribuir pra esse entendimento, esse trabalho teve por objetivo analisar a distribuição e estrutura populacional de quatro táxons de Serrasalmídeos, bem como determinar e comparar seus padrões de diversificação na bacia amazônica. Para tanto, foram utilizadas sequências do gene CO1 e da Região Controle do DNA mitocondrial de quatro espécies de Serrasalminidae, duas espécies de piranhas (*Serrasalmus rhombeus* e *Pygocentrus nattereri*) e duas espécies de pacus (*Myloplus schomburgkii* e *Myleus setiger*). *Serrasalmus rhombeus* e *P. nattereri* apresentaram linhagens altamente estruturadas dentro da bacia do rio Tocantins- Araguaia. Além disso, o primeiro táxon apresentou mais uma linhagem divergente na bacia do rio Xingu, enquanto *Pygocentrus nattereri* apresentou uma segunda linhagem na bacia do rio Guaporé. As duas espécies de pacu também apresentaram populações bem estruturadas dentro da área amostrada. *Myloplus schomburgkii* apresentou duas linhagens bem divergentes, uma em cada escudo, enquanto *M. setiger* apresentou quatro grupos bem definidos dentro da área amostrada, com um padrão de distribuição das linhagens por bacia hidrográfica. A evolução dos táxons de Serrasalminidae na bacia amazônica apresentou um padrão de dispersão da planície em direção às drenagens mais altas dos escudos. Foram observadas populações diferenciadas nas porções altas dos rios Xingu e Madeira para as piranhas, possivelmente como efeito da presença de barreiras físicas no curso desses rios, assim como populações de piranhas diferenciadas também na bacia dos rios Tocantins-Araguaia, provavelmente como efeito da separação dessa bacia do centro de dispersão dessas espécies, ou seja, a planície amazônica. Os pacus, cuja distribuição é mais restrita as áreas dos escudos, apresentaram padrões diferentes de separação das linhagens. Enquanto a distribuição de *Myloplus schomburgkii* parece ser interrompida pelo sistema Solimões-Amazonas segregando uma linhagem em cada escudo, *Myleus setiger* parece se diferenciar nas principais drenagens dentro dos escudos, em razão de seu estilo de vida reofílico e sua especialização trófica.

Palavras-chaves: *Serrasalmus rhombeus*, *Pygocentrus nattereri*, *Myloplus schomburgkii*, *Myleus setiger*, estrutura populacional, linhagens evolutivas, bacia amazônica

INTRODUÇÃO

A ictiofauna neotropical iniciou sua diversificação na Gondwana, com representantes das ordens Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes e Perciformes presentes na América do Sul e África (LUNDBERG, 1998). A diversidade de peixes de água doce dessa região é a maior do mundo, com uma estimativa de mais de 6.000 espécies ocorrendo nos grandes sistemas de rios da América do Sul (LÉVÊQUE *et al.*, 2008). Por conseguinte, a bacia Amazônica, uma área geográfica de cerca de 6.500 km², com uma incomparável rede de rios e habitats aquáticos, congrega a maior riqueza ictiológica do planeta com mais de 2.000 espécies descritas (LUNDBERG *et al.*, 2010; TISSEUIL *et al.*, 2013).

Embora os estudos sobre a biodiversidade Neotropical tenham aumentado ultimamente, nosso conhecimento acerca da diversidade de peixes dessa região bem como dos processos biogeográficos que geraram essa diversidade ainda são incipientes. Estima-se que 30 a 40% da ictiofauna neotropical ainda é desconhecida e, especialistas apontam para algo em torno de 2.000 espécies ainda a serem descritas (REIS *et al.*, 2016; LÉVÊQUE *et al.*, 2008). São reconhecidas 43 famílias de peixes de água doce endêmicas desta região (ALBERT, PETRY, REIS, 2011), um provável reflexo da história paleohidrológica e da diversificação de habitat ocorridos nos últimos 110 milhões de anos de isolamento com a África (ALBERT & REIS, 2011).

Estudos nas diversas áreas científicas (geologia, paleontologia, climatologia, biologia) têm mostrado que a região neotropical tem uma história evolutiva longa e complexa (HOORN *et al.*, 2010; LATRUBESSE *et al.*, 2010; MONTES *et al.*, 2015; MUNIS, 2013; ROSSETTTI *et al.*, 2015), e intimamente relacionada com a diversificação de sua biota (ALBERT, PETRY, REIS, 2011). Grande parte dessa diversificação teve início no Cretáceo, cerca de 120 a 100 Ma (ALBERT, PETRY, REIS, 2011). Mas, nos últimos 90 milhões de anos, a América do Sul sofreu suas mudanças estruturais mais importantes, incluindo aí o intemperismo de antigos escudos, grandes incursões marinhas, elevação da cadeia dos Andes e de antigos arcos estruturais, reconfiguração do tamanho e padrão das principais bacias de drenagem da região, e períodos de clima muito seco ou muito úmido (HOORN *et al.*, 2010), que promoveram uma incrível diversificação da biota na região (HUBERT & RENNO, 2006). No entanto, uma ligação clara da história física da região com a

origem, distribuição geográfica e ecologia das espécies de peixes da fauna neotropical não é totalmente clara (WINEMILLER *et al.*, 2008).

Várias hipóteses, baseadas em diferentes processos, têm sido propostas para explicar a origem e o padrão (ou os padrões) de distribuição da riqueza da fauna sul-americana (HUBERT & RENNO, 2006). Embora várias hipóteses de causas da especiação na Amazônia tenham sido propostas, duas delas são as mais difundidas (RIBAS *et al.*, 2012). São elas: a teoria dos refúgios, a qual postula que as flutuações climáticas do Pleistoceno causaram ciclos de contração e expansão das florestas tropicais, promovendo assim isolamento e diferenciação das espécies (HAFFER, 1997), e a hipótese de rios, a qual propõe que a dinâmica formação das grandes drenagens na Amazônia teria dividido a distribuição de muitos táxons causando diferenciação (BATES, HACKETT, CRACRAFT, 1998). Outras hipóteses postuladas para tentar entender esses processos de diversificação na Amazônia são: a hipótese de Museu, na qual segundo NORES (1999), as espécies se originaram por diferenciação alopatrica nas áreas altas da Amazônia durante os períodos de grandes incursões marinhas e se acumularam por dispersão nas terras baixas, as quais teriam funcionado como “museus”; e a hipótese paleográfica, onde as mudanças geológicas, como o soerguimento de paleoarcos resultantes da tectônica dos Andes durante o terciário, causariam especiação alopatrica, onde cada lado da barreira poderia abrigar biotas diferenciadas e espécies endêmicas (HOORN *et al.*, 1995; HUBERT & RENNO, 2006).

A estrutura do continente sul-americano é composta de várias unidades geotectônicas diferentes, como os crátons (Escudos Cristalinos do Brasil Central e Escudos das Guianas), as bacias intercratônicas (Orinoco, Amazonas, Parnaíba, São Francisco, Paraná), as bacias pericratônicas (Iquitos, Llanos, Chacos, Pampas) entre outras (ALBERT, PETRY, REIS, 2011). Essa heterogeneidade de ambientes com suas características peculiares abriga uma rica biota, e inclui grandes áreas de endemismo na Amazônia (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013).

A América do Sul passou por grandes mudanças na paisagem nos últimos 20 milhões de anos até chegar a sua forma atual. O soerguimento das porções Norte e Central da Cordilheira dos Andes, que iniciou há cerca de 15 milhões de anos, e culminou nos últimos 10 milhões de anos (LUNDBERG *et al.*, 1998), influenciou diretamente o estabelecimento dos cursos atuais dos rios da Amazônia, causando importante reorganização das drenagens do norte da América do Sul (HUBERT &

RENNO, 2006). No início do Mioceno, um sistema fluvial que partia do cráton amazônico em direção as bacias sub Andinas a oeste, sendo daí desviado para o norte em direção ao mar do Caribe, foi substituído por um imenso sistema de áreas alagadas, conhecido como lago Pebas. No final do Mioceno, o sistema Pebas progressivamente desapareceu dando lugar ao transcontinental sistema Solimões-Amazonas (SACEK, 2014).

Com relação ao cráton amazônico sua formação é muito mais antiga datando do Pré-Cambriano, possivelmente a formação geológica mais antiga do mundo com cerca de quatro bilhões de anos (WESSELINGH & HOORN, 2011). Os Escudos são principalmente compostos por rochas cristalinas de origem proterozóica, sobretudo granitos e gnaisses (HUBER, 2006). Pouco se sabe sobre a dinâmica dos rios que drenam os Escudos. No início do Mioceno essas drenagens fluíam para o oeste da Amazônia, porém com o surgimento do arco do Purus, os rios a leste dessa formação passaram a correr na direção do fluxo atual do rio Amazonas (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Embora muito mais antigos, os sistemas de drenagens do cráton amazônico parecem ter sofrido poucas mudanças (WESSELINGH & HOORN, 2011).

Como um campo da biogeografia, a filogeografia busca por aspectos históricos que levaram a distribuição contemporânea das linhagens gênicas (AVISE *et al.*, 1998). A realização de estudos filogeográficos entre populações da mesma espécie são mais frequentes, devido à maior facilidade de explicar os padrões de distribuição das genealogias na dimensão geográfica. Os processos de dispersão e vicariância de populações intraespecíficas são mais recentes e de caráter microevolutivo, se comparados aos eventos cladogenéticos responsáveis pela divergência entre táxons superiores. Muitos desses estudos têm tentado associar os padrões de diversificação da biota amazônica com processos climáticos e geológicos que influenciaram a distribuição dos táxons na América do Sul (LOVEJOY, ALBERT, CRAMPTON, 2006; WILLIS *et al.*, 2007; HUBERT & RENNO, 2006; HUBERT *et al.*, 2007a; FARIAS & HRBEK, 2008). No entanto, estudos filogeográficos em peixes Neotropicais de água doce são ainda raros perto do elevado número de espécies deste grupo.

Ainda assim, a filogeografia associada à filogenia têm dado importantes contribuições para o entendimento da evolução das populações, espécies e comunidades de peixes em distintos ambientes neotropicais (PIORSKI *et al.*, 2008),

sendo este um campo de estudo que leva em questão os processos que governam a distribuição geográfica de linhagens (AVISE, 2004). O entendimento desses processos permite inferir modelos hierárquicos de diferenciação genética e de estrutura filogeográfica que reflitam a história geográfica da região (BEHEREGARAY, SUNNUCKS, BRISCOE, 2002). Tais inferências, principalmente as relacionadas às reconstruções das espécies e a genealogias de populações, são baseadas principalmente em sequências de genes do DNA mitocondrial (DNAm) (LOVEJOY & DE ARAÚJO, 2000).

Poucos estudos dessa natureza têm sido realizados sobre as espécies de peixes da família Serrasalminidae (pacus e piranhas). HUBERT *et al.* (2007) encontraram populações de *Serrasalmus rhombeus* fortemente estruturadas nas drenagens do alto rio Madeira e, ao contrário do que eles supunham, essa estruturação foi mais relacionada a isolamento por distância entre as bacias de drenagens do que a um efeito dos diferentes tipos de água. Outro estudo populacional foi realizado por SANTOS, RUFFINO, FARIAS (2007) com *Colossoma macropomum*. Com uma ampla amostragem desse táxon na bacia Amazônica, os autores concluíram que o tambaqui constitui uma população panmítica na área analisada. Outros trabalhos analisaram a distribuição das espécies de um gênero de Serrasalminidae em particular como aquele realizado por FREEMAN *et al.* (2007) com espécies do gênero *Serrasalmus*, HUBERT *et al.* (2007) com espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus* e mais recentemente, MATEUSSI, PAVANELLI, OLIVEIRA, (2016) com espécies do gênero *Mylossoma*.

A família Serrasalminidae consiste de cerca de 90 espécies distribuídas em 17 gêneros (incluindo a espécie fóssil *Megapiranha paranensis*, CIONE *et al.* (2009). É um grupo de peixes endêmico das regiões neotropicais, amplamente distribuído em todos os maiores sistemas de rios da América do Sul, sendo abundantes nas bacias Amazônica e do Orinoco, ocorrendo também na bacia do sistema Paraná-Paraguai e rio São Francisco (REIS *et al.*, 2003). Habita uma grande variedade de corpos de água, incluindo o canal principal dos rios, os lagos, a floresta alagada, até ambientes de corredeiras e cachoeiras nas cabeceiras dos rios (GOULDING, 1980).

Indiscutivelmente, conhecer essa grande diversidade de serrasalmídeos, bem como entender os processos geradores dessa diversidade, são um importante desafio para a pesquisa científica, uma vez que seus habitat estão sendo constantemente alterados e os recursos neles presentes estão sendo cada vez mais explorados, face ao

aumentado crescimento populacional humano (TURNER *et al.*, 2004). Em vista disso, nosso trabalho tem por objetivo analisar a distribuição e estrutura populacional de duas espécies de piranhas e duas de pacus herbívoros, bem como determinar e comparar seus padrões de diversificação na bacia amazônica. O propósito maior deste estudo é contribuir para o conhecimento da diversidade de peixes na América do Sul e também gerar informações que possam subsidiar planos de conservação da ictiofauna amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem de peixes

Para esse estudo foram utilizadas quatro espécies de Serrasalminidae, sendo duas espécies de piranhas (*Serrasalmus rhombeus* e *Pygocentrus nattereri*) e duas espécies de pacus (*Myloplus schomburgkii* e *Myleus setiger*) (Figura 1). A escolha das espécies para esse trabalho foi baseada no resultado das análises de delimitação de espécies realizadas no capítulo I dessa tese. O DNA barcoding evidenciou a presença de linhagens bastante divergentes (acima de 2%) dentro de 10 espécies de Serrasalminidae, mostrando que a diversidade dentro desse grupo de peixes Neotropicais é subestimada. Trabalhos que busquem investigar a diversidade intraespecífica da ictiofauna amazônica ainda são esporádicos, e especificamente para os peixes Serrasalmídeos o número é mais reduzido. O objetivo desse trabalho foi avaliar o grau de divergência das linhagens dentro desses quatro táxons e comparar seus padrões de diversificação dentro da bacia Amazônica.

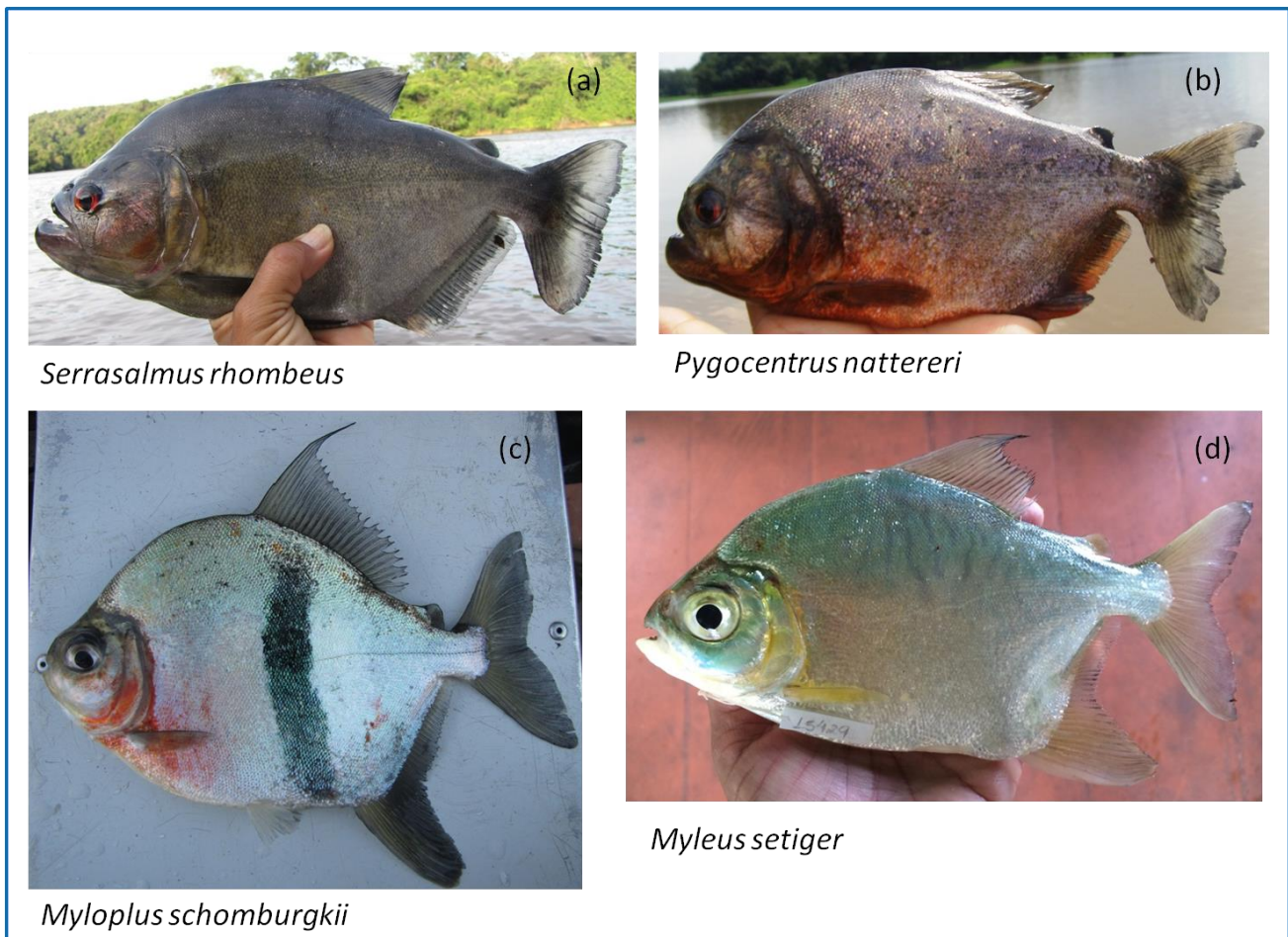


Figura 2. Espécies de Serrasalmidae utilizadas nesse estudo. (a) e (b) Piranhas, (c) e (d) Pacus

As amostras foram coletadas nos rios São Bento (MA), Tocantins, Araguaia, Xingu, Tapajós, Aripuanã e rio São Domingos (bacia do Guaporé), no Escudo Brasileiro; nos rios Jari, Trombetas, Nhamundá, Jatapu, Pitinga, Branco, Negro e Orinoco, no Escudo das Guianas; além de três localidades da calha Solimões-Amazonas: Igapó-Açu, Lago Grande de Maués e Itacoatiara (Figura 2). A amostragem foi realizada com a utilização de baterias de malhadeiras, tarrafas e anzóis.

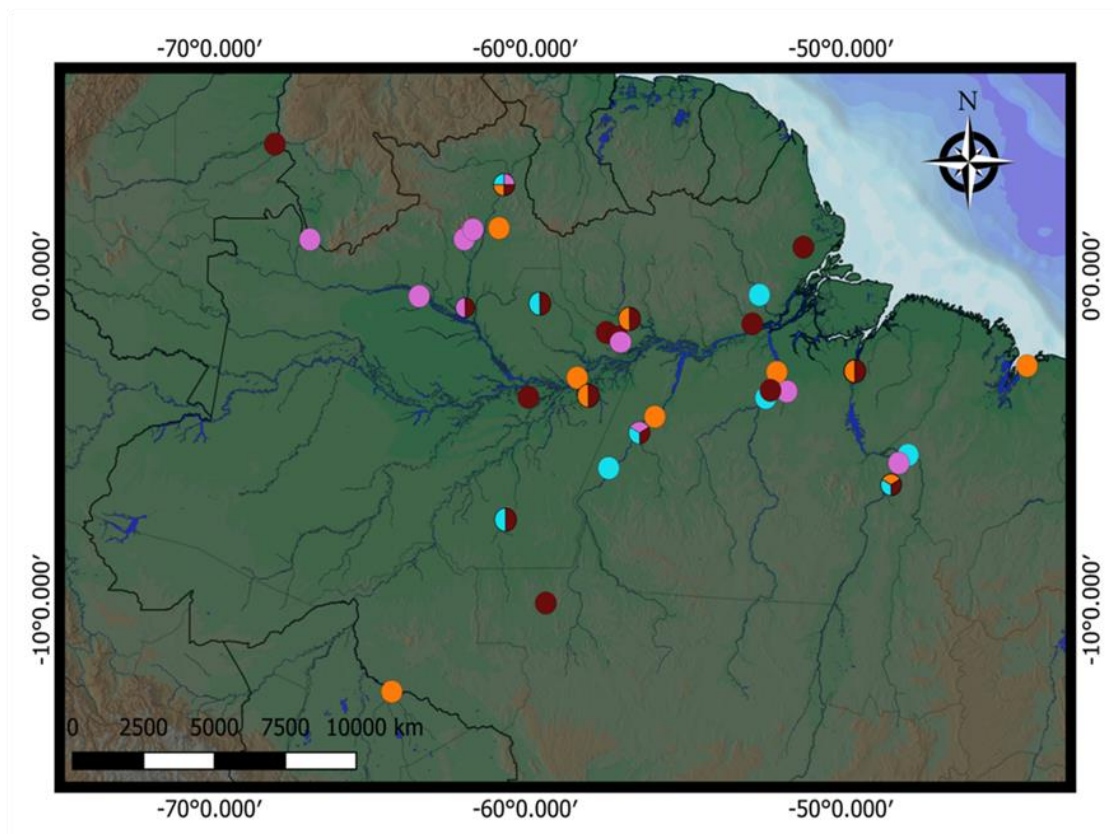


Figura 2. Localidades de coleta dos Serrasalmídeos na bacia Amazônica e bacia do Orinoco. Circulos vermelhos, *Serrasalmus rhombeus*; laranjas, *Pygocentrus nattereri*; rosas, *Myloplus schomburgkii*; azuis, *Myleus setiger*

Os exemplares coletados, quando necessário, foram sacrificados com uma dose letal de anestésico a base de óleo de cravo (Eugenol), e triados. Indivíduos de pequeno porte foram preservados em álcool 95% e, dos indivíduos maiores, foi retirada a nadadeira peitoral e o tecido muscular associado, os quais foram preservados em álcool 95%, e o exemplar fixado em formalina (10%). As amostras de tecido foram depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal da Universidade Federal do Amazonas - UFAM e, os *vouchers* na Coleção Ictiológica do INPA. A identificação taxonômica das espécies foi feita por especialistas no grupo e com a utilização de chaves dicotômicas, literatura especializada, e comparação com exemplares depositados em museus e coleções científicas. Todas as coletas foram realizadas com autorização do IBAMA/MMA.

Extração do DNA, Amplificação e Sequenciamento do gene COI e da Região Controle

O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo de CTAB 2% (NaCl, EDTA 0,5M, Tris HCL 1M, PVP polivinil) (DOYLE & DOYLE, 1987), com algumas modificações, e adição de Proteinase K.

Os dois fragmentos do DNA mitocondrial foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando o coquetel de *primers* Mafish (FishF2_FishR2 e VF2_VR1d) (IVANOVA *et al.*, 2007) para o COI e os *primers* DLOstarir1 e ProF para a Região Controle (Tabela 1). As reações de PCR tiveram um volume final por amostra de 15 µl sendo: 1µl de DNA genômico total; 1,2 µl de MgCl₂ (25mM); 1,2 µl de DNTP (10mM); 1,5 µl de Buffer 10X(75 mM Tris HCL, 50 mM KCL, 20 mM (NH₄)₂SO₄); 1,5 µl do coquetel de *primers* (para o gene COI) e 1,5 µl de cada *primer* (para a Região Controle); 0,3 µl de Taq DNA Polimerase (1U) e 8,3 µl de H₂O. As condições de PCR seguiram os procedimentos gerais de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto (uma única vez), 35 ciclos de desnaturação a 93°C por 10 segundos; anelamento a 50°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 1:30 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos (uma única vez).

O produto da PCR foi purificado por reação enzimática utilizando as enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase (ExoSap).

Os PCRs de sequenciamento tiveram um volume final por amostra de 10 µl, sendo: 2 µl de DNA amplificado e purificado; 2 µl do *primer*; 0,5 µl do *Big Dye*; 1,45 µl de tampão do *Big Dye* e 4,5 µl de água *miliq.* Em seguida, as amostras de DNA resultantes deste PCR foram submetidas ao protocolo de precipitação com Etanol 100%/EDTA, e as sequências nucleotídicas foram determinadas pelo sequenciador automático *ABI 3500 (Applied Biosystems)*.

Tabela 1. *Primers* usadas nas reações de PCR para amplificação do gene Citocromo C Oxidase subunidade I - COI e da Região Controle – DLoop do DNA mitocondrial.

Gene	<i>Primers</i>	Referência
COI	FishF2 5` TGTA AACGACGGCCAG 3`	Ivanova et al., 2007
	FishR2 3` CAGGAAACAGCTATGAC 5`	
	VF2 5` TGTA AACGACGGCCAG 3`	
	VR1d 3` CAGGAAACAGCTATGAC 5`	
<i>Dloop</i>	LProF 5` AACYCCCRCCCCTAAC YCCCAAAG 3`	Presente estudo
	DLostariR1 3` GTAA AACGACGGCCAGTCCTGGTTTH 5`	

Edição de sequências e análise de dados

As sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta de alinhamento MAFFT implementada no *software* Geneious 7.0.6 (KEARSE *et al.*, 2012) e editadas manualmente. As sequências do gene COI foram ainda traduzidas em aminoácidos hipotéticos para verificação de inserções, deleções e códons de parada inesperados.

Para todas as análises, as sequências do gene COI e da Região Controle foram utilizadas de forma concatenada para cada um dos indivíduos. A concatenação das sequências destas regiões é adequada considerando que o DNA mitocondrial é herdado como uma única molécula, sem recombinação e todas as sub-regiões experimentam a mesma história evolutiva devido ao seu padrão de mutação (MEYER, 1993).

As relações filogenéticas para cada espécie de Serrasalminidae foram estimadas através de inferência bayesiana com dez milhões de cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) no *software* MrBayes 3.2 (RONQUIST, HUELSENBECK, TESLENKO, 2011). A cada 1000 gerações foi realizada a amostragem de uma árvore. O modelo de evolução molecular que melhor se ajustou aos dados foi avaliado com o programa jModeltest 2.0 (DARRIBA *et al.*, 2012). Cinco por cento das primeiras gerações MCMC foram descartadas e as relações filogenéticas e

probabilidades posteriores estimadas com as árvores restantes. As topologias com probabilidades posteriores maiores que 0,95 foram consideradas bem sustentadas (WILCOX *et al.*, 2002).

O compartilhamento de haplótipos é uma das mais fortes evidências para detectar fluxo gênico entre populações, acompanhado de uma falta clara de monofilia recíproca entre os haplótipos associados às áreas comparadas (WILLIS *et al.*, 2010). Para testar essa hipótese entre as populações das espécies de Serrasalmidae, foi realizada uma análise para estabelecer relações filogenéticas entre estas, inferida através de uma abordagem estatística de máxima verossimilhança com 2000 réplicas no programa Treefinder (JOBBER, 2011). O modelo evolutivo utilizado foi o Hasegawa- Kishino-Yano (HKY85) com a probabilidade de mudança do estado de um nucleotídeo para outro assumido seguir uma distribuição gama. Esse modelo foi previamente determinado no programa jModelTest (DARRIBA *et al.*, 2012), usando o Bayesian Information Criterion.

Posteriormente, para visualizar a relação e distribuição dos haplótipos obtida entre as populações de *Myloplus schomburgkii*, *Myleus setiger*, *Serrasalmus rhombeus* e *Pygocentrus nattereri*, foi utilizado o programa HaploViewer (SALZBURGER, EWING, VON HAESELER, 2011).

Para testar a hipótese nula de panmixia entre os grupos naturais das espécies de Serrasalmidae, foi realizada uma Análise de Variância Molecular (AMOVA)(EXCOFFIER, SMOUSE, QUATTRO, 1992), implementada no software ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER, LAVAL, SCHNEIDER, 2005), para verificar a existência de populações geneticamente diferenciadas entre os pontos de coleta analisados. O fluxo gênico indireto e o grau de estruturação das populações também foram avaliados neste software, cuja análise é baseada nas diferenças das frequências nucleotídicas. Para tanto, foi estimado o Φ_{ST} par a par (WEIR & COCKERHAM, 1984), modificação do F_{ST} (WRIGHT, 1969), entre todas as localidades amostradas, com associado valor e significância estatística (P) para a rejeição ou não da hipótese nula de panmixia ($F_{ST} = 0$) entre as populações comparadas.

Para inferir a estrutura genética e possíveis grupos biológicos dentro dos Serrasalmidae foi utilizado o programa BAPS (CORANDER *et al.*, 2013), o qual permite a especificação *a priori* do limite superior de grupos (k) a serem testados pelo algoritmo, onde este tenta identificar a probabilidade posterior da partição em

subpopulações na faixa de 1 até o k dado *a priori*. Neste caso, foi testado um $k = 20$ para *Serrasalmus rhombeus* e, um $k = 10$ para *Pygocentrus nattereri*, *Myloplus schomburgkii* e *Myleus setiger*.

Para determinar a relação entre as linhagens e o tempo de divergência entre as mesmas foi realizada uma Análise Bayesiana Coalescente no programa BEAST 1.8.2 (DRUMMOND & RAMBAUT, 2007) usando o modelo de relógio molecular relaxado (DRUMMOND *et al.*, 2006). Os tempos de divergência das linhagens foram estimados através de uma calibração secundária utilizando estimativas de divergência dentro do grupo das piranhas (17 Ma) e do grupo *Myleus* (28 Ma) publicadas por THOMPSON *et al.* (2014).

Os parâmetros para as análises dos dados no BEAST foram assim definidos: modelos de substituição (HKY+G) para todas as espécies, um relógio molecular relaxado não correlacionado (adequado para análises no nível populacional) com taxa de 1.0 (indicando para o programa gerar os tempos relativos em termos de número de mutações). Para as reconstruções genealógicas entre indivíduos, foi selecionado um modelo de especiação de nascimento e morte, com os demais *priors* permanecendo os *defaults* sugeridos pelo programa. A corrida das análises foi feita considerando 200 milhões de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC). A robustez e validação da corrida foram conferidas através dos valores de ESS (> 200) e autocorrelação dos parâmetros. A convergência das cadeias foi conferida através do programa Tracer dentro do mesmo pacote do BEAST.

Informações relacionadas com as árvores obtidas, como o número de mutações, probabilidade posterior, limites da densidade da probabilidade, etc., foram sumarizadas no software *TreeAnnotator* assumindo um *burn-in* de 20 milhões, e a árvore anotada visualizada no programa *Figtree*, ambos dentro do pacote BEAST.

Para inferir a história biogeográfica das espécies de Serrasalminidae, foi realizada uma abordagem de Dispersão-Vicariância (S-DIVA), YU *et al.* (2015), implementada no programa RASP 3.2 (YU *et al.* 2015). S-DIVA determina as frequências das áreas ancestrais reconstruídas para um nó como o número de vezes que uma área ocorre no conjunto de reconstruções desse nó em um conjunto de árvores, e soma o produto dessas frequências e da probabilidade do nó em todas as reconstruções para obter a probabilidade da área ancestral (NYLANDER *et al.*, 2008; HARRIS & XIANG, 2009). Essa metodologia é baseada na análise de dispersão-vicariância (DIVA) (RONQUIST, 1997) para um conjunto de árvores gerado por

análises de inferência Bayesiana de filogenias, desta forma gerando uma pseudo-distribuição posterior das áreas ancestrais de cada nó (NYLANDER *et al.*, 2008; HARRIS & XIANG, 2009). Tal abordagem contorna dois problemas identificados na análise de dispersão-vicariância (DIVA). Primeiro: DIVA ignora a incerteza na inferência filogenética, sendo as áreas ancestrais reconstruídas em apenas uma árvore na qual se assume não haver erros (NYLANDER *et al.*, 2008). Segundo: ela produz múltiplas reconstruções igualmente ideais que muitas vezes resultam em múltiplas reconstruções para nós ancestrais (RONQUIST, 1997; NYLANDER *et al.*, 2008).

RESULTADOS

Foram sequenciados em média 600 pares de base do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I e 670 pares de bases da Região Controle para 71 espécimes de *Serrasalmus rhombeus*, 35 de *Pygocentrus nattereri*, 26 de *Myloplus schomburgkii* e 26 de *Myleus setiger*. As análises foram feitas separadamente para cada táxon e os resultados são apresentados por espécie.

Serrasalmus rhombeus

O banco de dados concatenado para essa espécie foi composto de 71 sequências com 1209 pares de base, sendo sete provenientes do rio Xingu, sete do Tocantins- Araguaia, quatro da calha do rio Amazonas, seis do rio Tapajós, oito do rio Branco, sete do rio Orinoco, seis do rio Nhamundá, quatro do Aripuanã, seis do rio Trombetas, nove do rio Pitinga e quatro do rio Jari. Sequências de *Pygocentrus cariba* foram usadas como grupo externo. O modelo evolutivo mais adequado para esse banco de dados foi HKY+G. Os resultados da análise Bayesiana mostraram três principais linhagens dentro desse táxon: a primeira composta por indivíduos coletados na bacia do rio Xingu, a segunda composta por indivíduos provenientes da bacia dos rios Tocantins e Araguaia, e a terceira que reúne todos os indivíduos coletados nas demais localidades na bacia Amazônica e bacia do rio Orinoco (Figura 3).

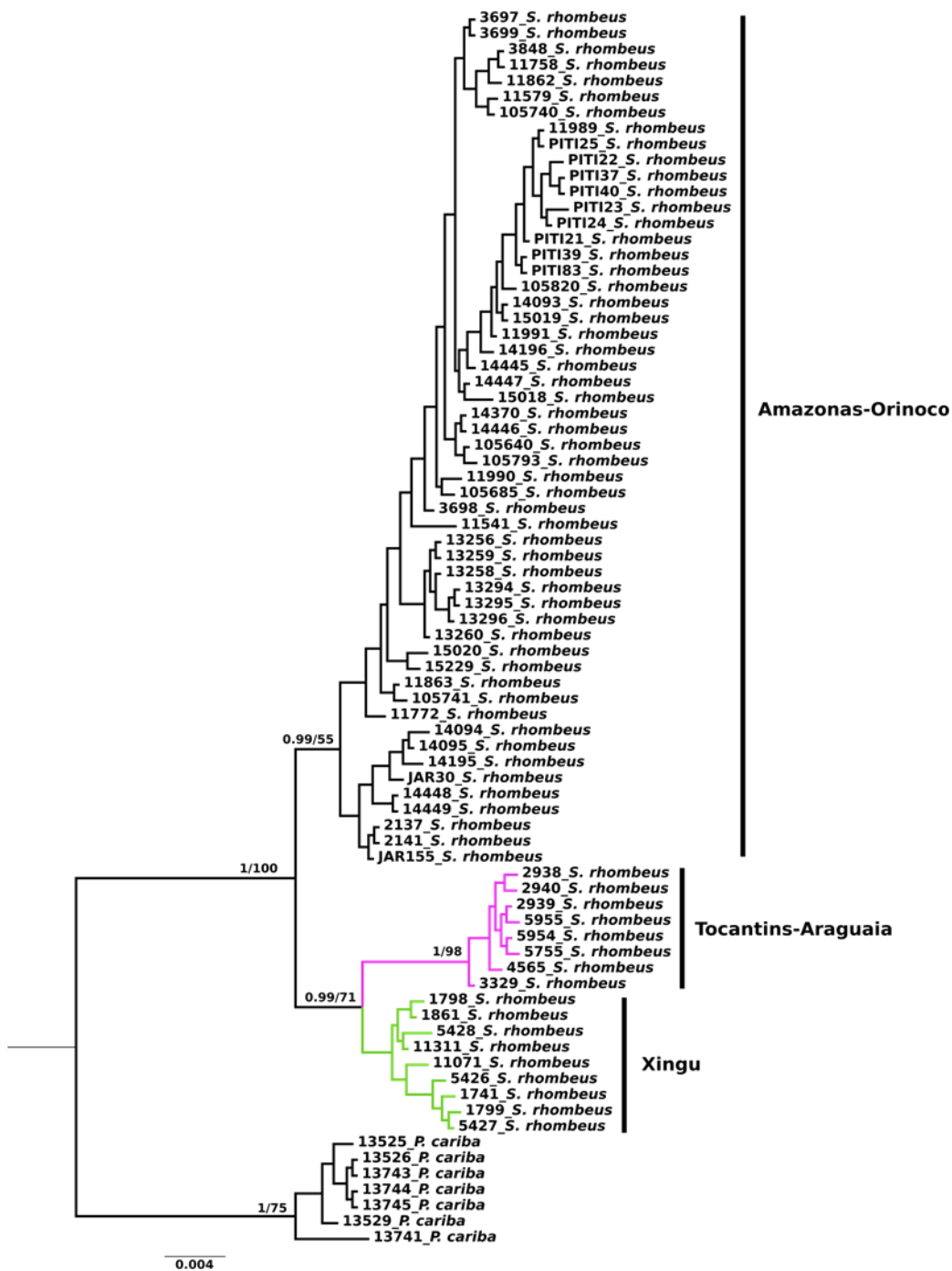


Figura 3. Relações filogenéticas dos haplótipos COI e Dloop de *Serrasalmus rhombeus*. Topologia gerada por inferência bayesiana com valores estatísticos expressos em probabilidade posterior e *bootstrap* (máxima verossimilhança), respectivamente. As cores dos ramos correspondem às linhagens encontradas nesse táxon.

O número de haplótipos entre as localidades variou de um (rio Orinoco) a sete (rio Xingu). As 71 sequências de *S. rhombeus* foram resumidas em 37 haplótipos únicos os quais foram compartilhados entre as localidades do Amazonas, Aripuanã, Trombetas, Nhamundá, Branco, Pitinga e Tapajós, com as demais localidades não compartilhando haplótipos. As populações de *S. rhombeus* do Xingu e Tocantins-Araguaia apresentaram haplótipos exclusivos (Figura 4).

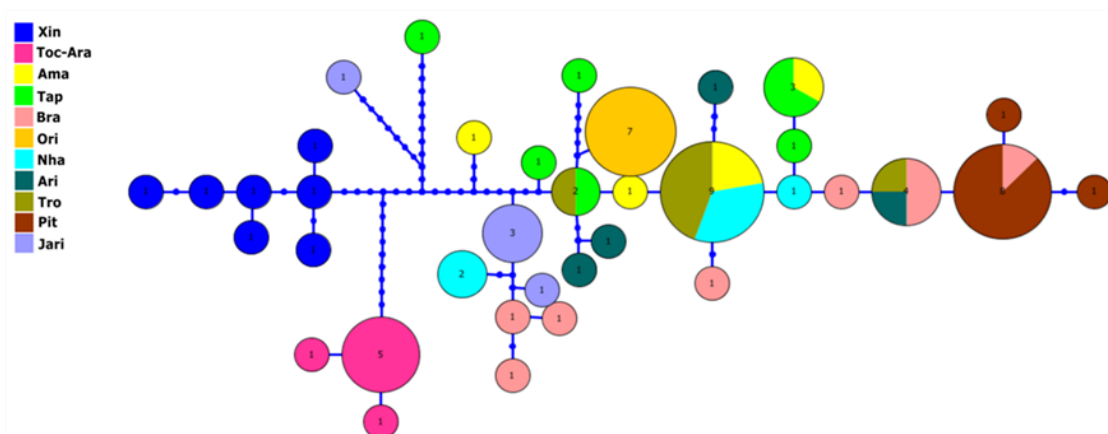


Figura 4. Rede de haplótipos com o gene COI e a Região Controle mitocondrial representando as dispersões de *Serrasalmus rhombeus* entre as bacias hidrográficas do Amazonas e Orinoco.

A estrutura genética das populações de *S. rhombeus* foi avaliada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA). Para esse táxon foi realizada apenas uma análise considerando cada localidade de coleta como uma população. O objetivo dessa análise foi determinar os níveis de diferenciação genética entre todas as localidades de *S. rhombeus*. Os resultados obtidos indicaram a existência de uma diferenciação genética forte entre as populações, com valor de $\Phi_{ST} = 0,68990$ ($p=0.000$), com maior variabilidade genética entre (68,99%) do que dentro das localidades (31,01%). Esse alto grau de estruturação entre as populações foi confirmado pelo resultado das comparações par a par do Φ_{ST} que exibiram significativos valores de P após correção de Bonferroni, para a maioria das comparações envolvendo as populações de *S. rhombeus* do Xingu, Tocantins-Araguaia, Orinoco e rio Pitinga (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas para as sequências concatenadas do gene COI e da Região Controle de *Serrasalmus rhombeus*. Valor significativo de $P < 0,002$ em negrito.

	Xin	Toc	AM	Tap	Bra	Ori	Nha	Ari	Tro	Pit	Jar
Xin	--										
Toc	0.8634	--									
Ama	0.7518	0.8748	--								
Tap	0.6950	0.8140	-0.0506	--							
Bra	0.7639	0.8613	0.0905	0.0952	--						
Ori	0.8959	0.9736	0.4998	0.3666	0.5006	--					
Nha	0.7836	0.8968	-0.0171	0.0285	-0.0039	0.5603	--				
Ari	0.7752	0.9069	0.0032	-0.0222	0.0830	0.6245	0.0750	--			
Tro	0.8401	0.9391	0.0059	0.0514	0.1448	0.6957	0.0818	0.2031	--		
Pit	0.9024	0.9716	0.4862	0.4011	0.3617	0.8871	0.5381	0.5901	0.5877	--	
Jar	0.7120	0.8465	0.3177	0.3014	0.2999	0.6792	0.3037	0.3648	0.5178	0.7237	--

A análise de agrupamentos biológicos (BAPS) para *S. rhombeus* determinou cinco grupos biológicos ($\ln = -1339.0366$) dentro desse táxon. Um grupo exclusivo do rio Xingu (azul), outro exclusivo da bacia do Tocantins-Araguaia (rosa), um grupo compartilhado pelas localidades de Amazonas, Tapajós, Branco, Orinoco, Nhamundá, Aripuanã, Trombetas e Pitinga (amarelo), outro grupo compartilhado por Amazonas, Branco, Nhamundá, Aripuanã e Jari (verde), e o quinto grupo compartilhado apenas por Tapajós e Jari (vermelho) (Figura 5).

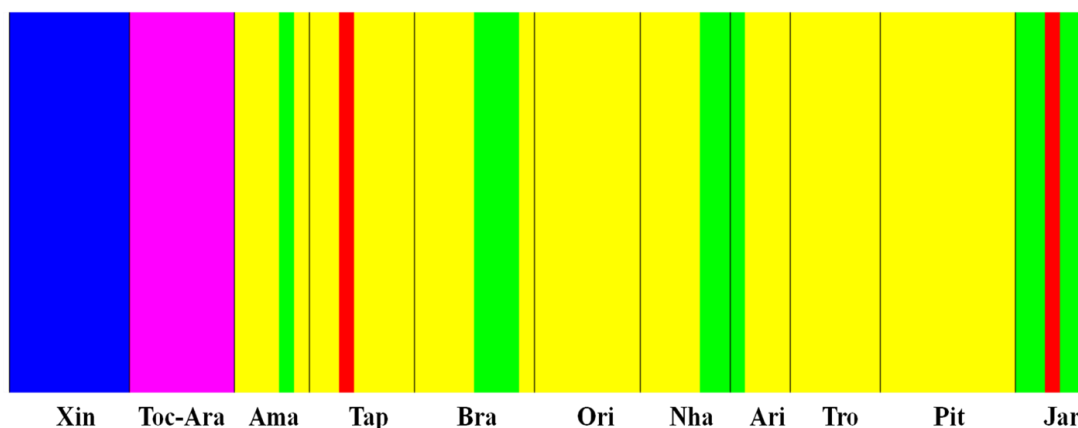


Figura 5. Grupos biológicos encontrados dentro de *Serrasalmus rhombeus* utilizando o gene COI e a Região Controle do DNA mitocondrial no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam o mesmo grupo biológico. **Xin:** rio Xingu; **Toc-Ara:** rios Tocantins-Araguaia; **Ama:** localidades da calha do rio Amazonas; **Tap:** rio Tapajós; **Bra:** bacia do rio Branco; **Ori:** rio Orinoco; **Nha:** rio Nhamundá; **Ari:** rio Aripuanã; **Tro:** rio Trombetas; **Pit:** rio Pitinga; **Jar:** rio Jari

Pygocentrus nattereri

As 35 sequências concatenadas de *P. nattereri*, sendo cinco do rio São Bento (MA), sete do Tocantins-Araguaia, quatro da calha do rio Amazonas, uma do baixo rio Xingu, cinco do rio Tapajós, seis do rio Branco, duas do rio Trombetas e cinco do Guaporé, renderam 971 pares de bases. Destes, 91 foram sítios variáveis sendo 82 deles informativos para parcimônia. Como grupos externos foram utilizados *P. piraya*, *Serrasalmus brandtii* e *S. gouldingi*. O modelo evolutivo determinado pelo jModelTest para esse banco de dados também foi HKY+G. Os resultados da análise Bayesiana mostraram três grupos dentro dessa espécie (Figura 6): (1) grupo Amazonas; (2) grupo Guaporé; (3) grupo Maranhão/Araguaia. O grupo Amazonas foi composto por indivíduos coletados em localidades no rio Amazonas (Maués), rio Tapajós, rio Branco, rio Trombetas e baixo rio Xingu. O grupo Guaporé foi composto por indivíduos coletados na bacia do rio Guaporé (cinco indivíduos) e por um indivíduo coletado no Amazonas (Lago Grande de Maués). Grupo Maranhão/Araguaia composto de indivíduos de *P. nattereri* coletados no rio São Bento (Maranhão), no rio Araguaia e no rio Tocantins.

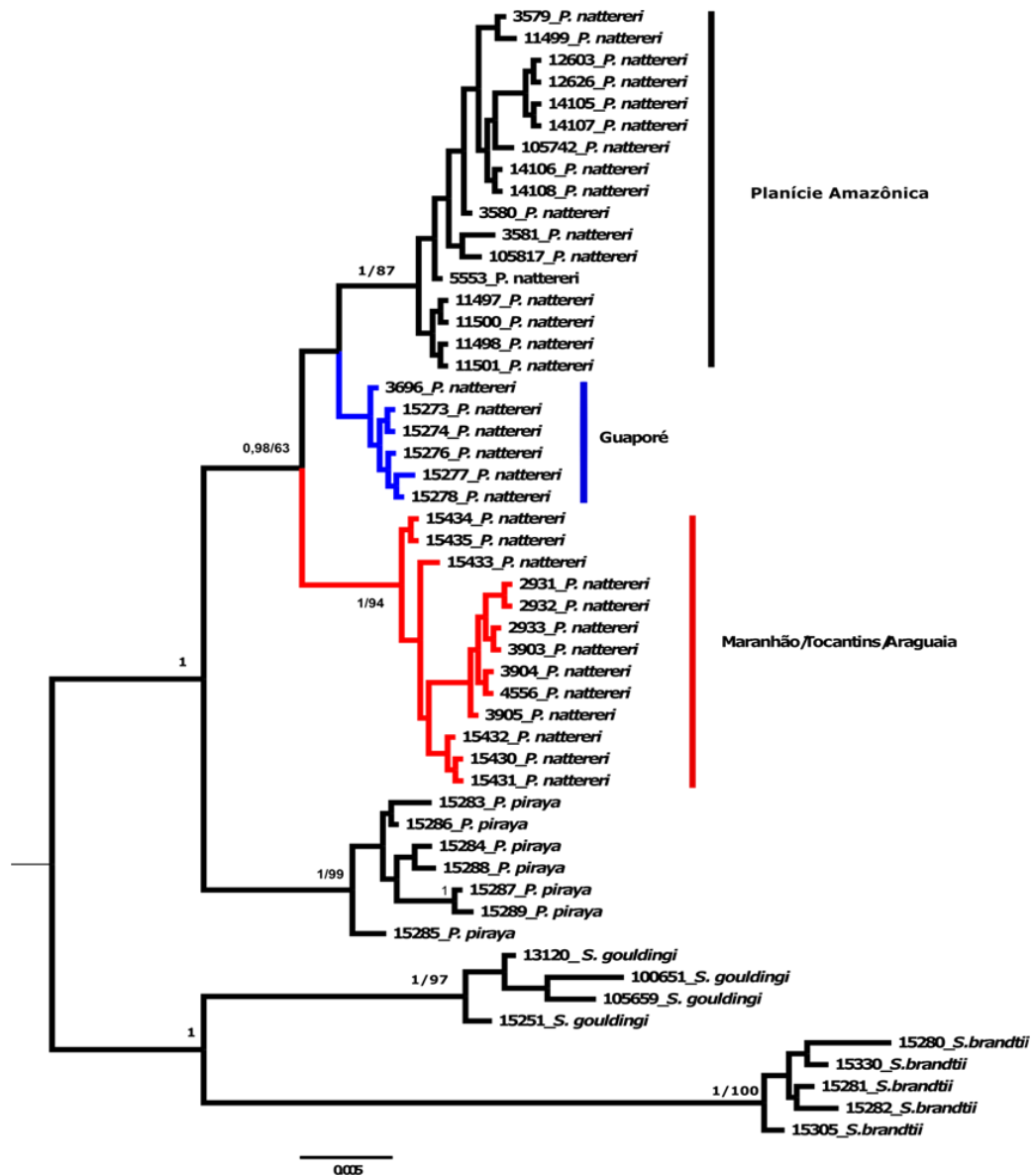


Figura 6. Relações filogenéticas dos haplótipos de COI e Dloop de *Pygocentrus nattereri*. Topologia gerada por inferência bayesiana com valores estatísticos expressos em probabilidade posterior e *bootstrap* (máxima verossimilhança), respectivamente. As cores dos ramos correspondem às linhagens encontradas nesse táxon.

O número de haplótipos de *P. nattereri* variou de um na bacia do Tocantins-Araguaia a quatro na bacia do Amazonas. As 35 sequências foram resumidas em 11 haplótipos, os quais foram compartilhados entre Xingu, Amazonas, Tapajós, Branco e Trombetas e entre Amazonas e Guaporé. Maranhão e Tocantins-Araguaia apresentaram haplótipos exclusivos (Figura 7).

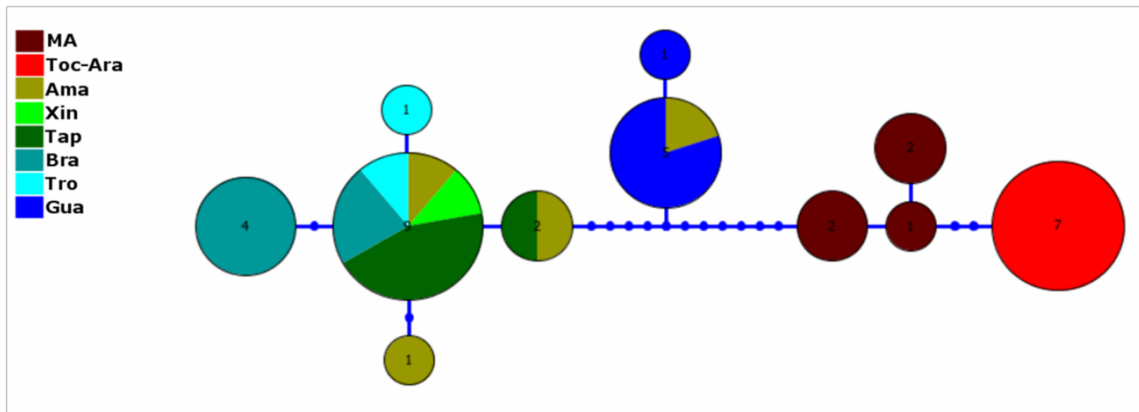


Figura 7. Redes de haplótipos com o gene COI e a Região Controle mitocondrial representando as dispersões de *Pygocentrus nattereri* entre as bacias hidrográficas do Amazonas.

A análise de variância molecular (AMOVA) inicialmente foi realizada considerando cada uma das sete localidades de coleta de *P. nattereri* (não considerando baixo rio Xingu) como uma população. Os resultados mostraram uma forte evidência de isolamento entre as populações dessa espécie, com $\Phi_{ST} = 0,86565$ ($p=0.000$). Para a maioria das comparações envolvendo as localidades de Guaporé, Maranhão e Tocantins-Araguaia, os valores das estimativas par a par do Φ_{ST} corroboraram essa estruturação com significativos valores de P , após correção de Bonferroni, (Tabela 3). Foi realizada então outra análise considerando apenas quatro populações: Guaporé, Maranhão, Tocantins-Araguaia e Amazonas. Os resultados foram os mesmos encontrados com as populações separadas, com valor de $\Phi_{ST} = 0,86675$ ($p=0.000$). Nas comparações par a par do Φ_{ST} os valores de P foram significativos para todas as comparações, após correção de Bonferroni.

Tabela 3. Valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas para as sequências concatenadas do gene COI e da Região Controle de *Pygocentrus nattereri*. Valor significativo de $P < 0,002$ em negrito.

	Maranhão	Toc_Ara	Tapajós	Guaporé	Amazonas	Branco	Trombetas
Maranhão	--						
Toc_Ara	0.8354	--					
Tapajós	0.9062	0.9799	--				
Guaporé	0.8936	0.9842	0.9347	--			
Amazonas	0.7475	0.8751	-0.0000	0.6666	--		
Branco	0.9000	0.9708	0.4560	0.9221	0.2670	--	
Trombetas	0.8741	0.9828	0.1719	0.9280	-0.0925	0.4453	--

O BAPS determinou três grupos biológicos ($ln = -324.3005$) dentro de *P. nattereri*, com as localidades do Rio São Bento (Maranhão) e Tocantins-Araguaia compartilhando o mesmo grupo biológico. A localidade de Guaporé compartilhou outro grupo com a localidade Amazonas (lago Grande de Maués), o qual também compartilha um grupo com as localidades de Tapajós, Branco e Trombetas (Figura 8).

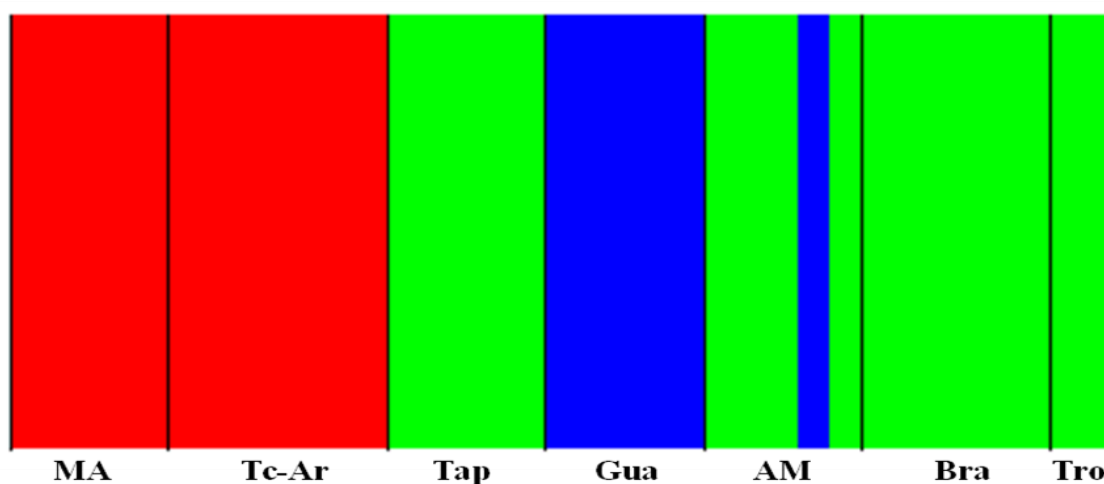


Figura 8. Grupos biológicos encontrados dentro de *Pygocentrus nattereri* utilizando o gene COI e a Região Controle do DNA mitocondrial no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam o mesmo grupo biológico. **MA:** rio São Bento (Maranhão); **Tc-Ar:** rios Tocantins-Araguaia; **Tap:** rio Tapajós; **Gua:** rio Guaporé (alto Madeira); **AM:** localidades da calha do rio Amazonas; **Bra:** rio Branco; **Tro:** rio Trombetas.

Myloplus schomburgkii

Para essa espécie, foram analisadas 26 amostras provenientes dos rios Negro (sete), Branco (sete) e Nhamundá (quatro) no Escudo das Guianas, e rios Tapajós (seis), Xingu (uma) e Araguaia (duas) no Escudo Brasileiro (Figura 2). O alinhamento das 26 seqüências concatenadas rendeu 1.118 pares de bases dos quais 51 foram variáveis e 37 informativos para parcimônia. Como grupos externos foram usados *Myloplus rhomboidalis* e *Myleus setiger*. O modelo evolutivo mais adequado ao banco de dados de *M. schomburgkii* foi HKY+G. A análise Bayesiana indicou dois grupos para esse táxon (Figura 9). Um grupo para o Escudo das Guianas e outro para o Escudo Brasileiro.

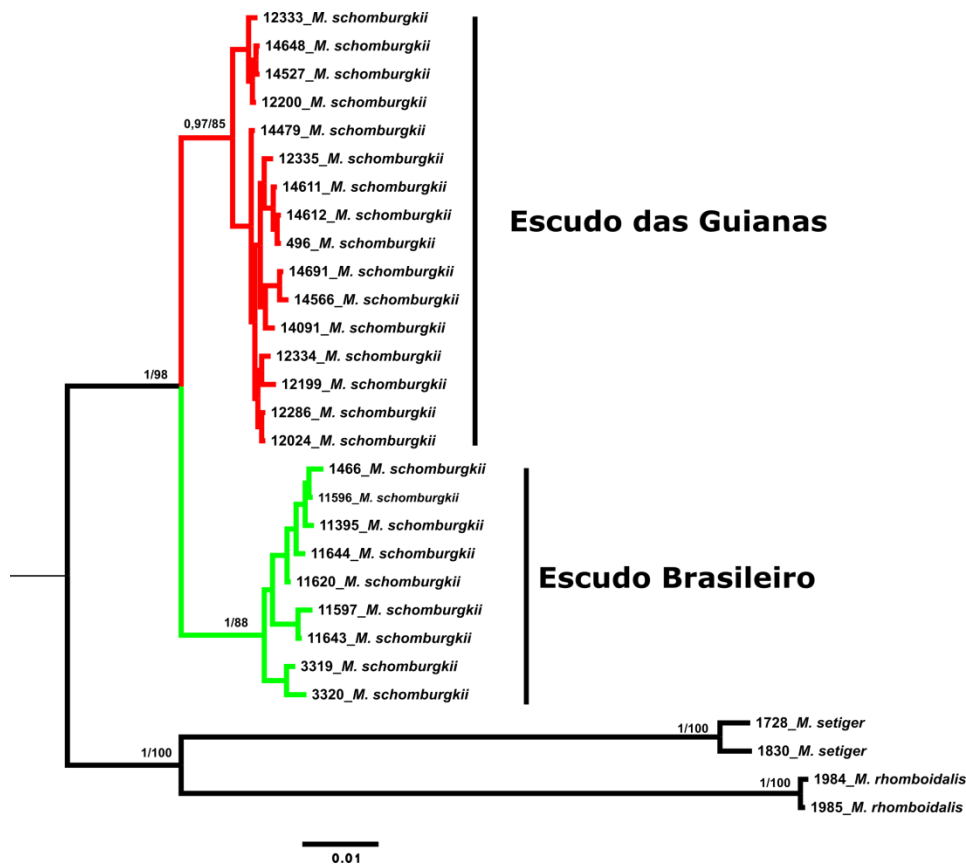


Figura 9. Relações filogenéticas dos haplótipos COI e Dloop de *Myloplus schomburgkii*. Topologia gerada por inferência bayesiana com valores estatísticos expressos em probabilidade posterior e *bootstrap* (máxima verossimilhança), respectivamente. As cores dos ramos correspondem às linhagens encontradas nesse táxon.

O número de haplótipos entre as localidades variou de um (rio Xingu) a seis (rios Tapajós, Branco e Negro). As 26 sequências desse táxon, foram resumidas em 20 haplótipos únicos os quais foram compartilhados apenas entre as localidades dentro do Escudo das Guianas (Figura 10).

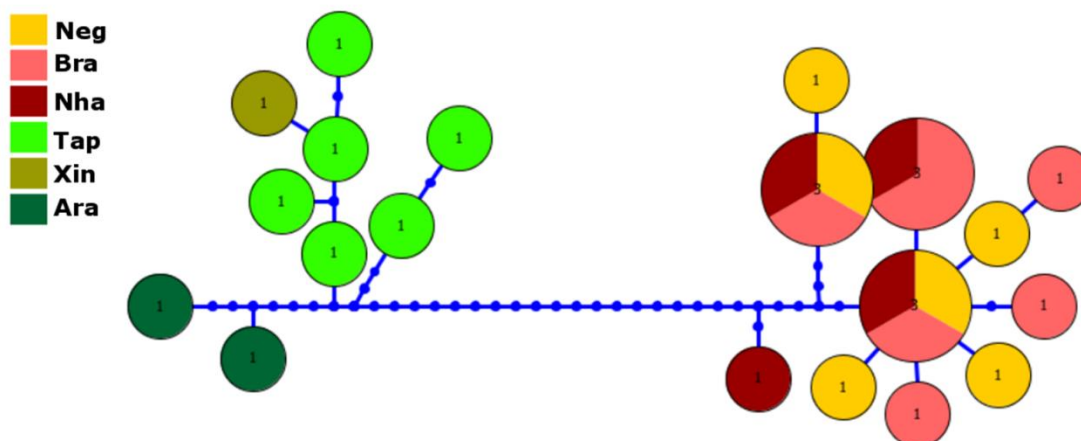


Figura 10. Rede de haplótipos com o gene COI e Região Controle mitocondrial representando as dispersões de *Myloplus schomburgkii* entre as bacias hidrográficas do Amazonas e Tocantins-Araguaia.

A estrutura genética das populações de *M. schomburgkii* foi avaliada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA). Inicialmente foi realizada uma análise entre as cinco localidades, como um único grupo hierárquico, visando determinar os níveis de diferenciação genética entre todas as localidades amostradas. Os resultados obtidos indicaram que existe uma diferenciação genética forte entre as populações, com valor de $\Phi_{ST} = 0,72795$ ($p=0.000$), com maior variabilidade genética entre (72,79%) que dentro das localidades (27,21%). Nesta análise, as amostras dos rios Xingu e Araguaia foram agrupadas em uma única população em razão do baixo número amostral em cada bacia e também com base nos resultados da análise Bayesiana. Essa forte estruturação genética foi corroborada pelas estimativas par a par do Φ_{ST} , onde os valores de P foram significativos para as localidades do Escudo das Guianas em relação às localidades do Escudo Brasileiro (Tabela 4). Dada a forte estruturação observada entre as populações de *M. schomburgkii* dos dois Escudos, foi realizada outra análise de variância considerando apenas duas populações, uma em cada Escudo. Os resultados obtidos para este agrupamento também demonstraram uma forte estruturação entre os dois grupos, com valor de $\Phi_{ST} = 0,81678$ ($p=0.000$).

A comparação para a par dos valores de Φ_{ST} confirmam essa estruturação, com significativo valor de P entre as duas localidades.

Tabela 4. Valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas para as sequências concatenadas do gene COI e da Região Controle de *Myloplus schomburgkii*. Valores significativos de $P < 0,002$ em negrito.

	Negro	Branco	Nhamundá	Tapajós	Xin_Ara
Negro	--				
Branco	-0.0401	--			
Nhamundá	-0.1098	-0.0322	--		
Tapajós	0.8232	0.8438	0.7924	--	
Xin_Ara	0.8064	0.83792	0.7607	0.1891	--

O resultado do BAPS para *M. schomburgkii* determinou dois grupos biológicos ($\ln = -439.2669$) dentro das populações desse táxon. As localidades do rio Negro, rio Branco e rio Nhamundá no Escudo das Guianas compartilharam um grupo biológico e as localidades do Escudo Brasileiro (Tapajós, Xingu e Araguaia), outro grupo (Figura 11).

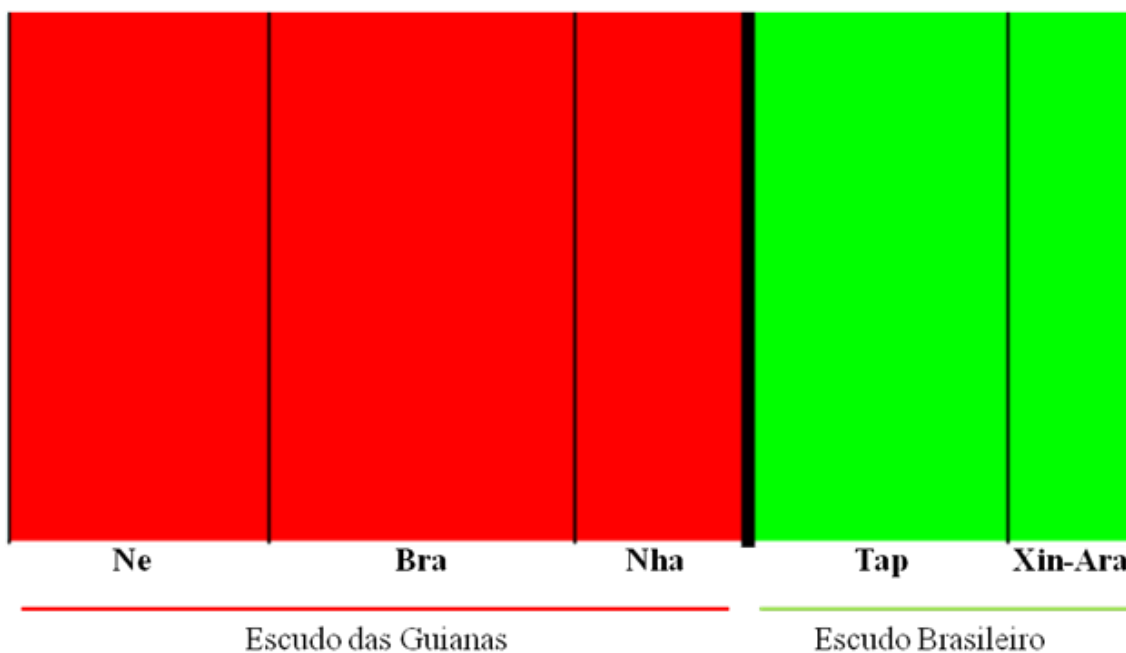


Figura 11. Grupos biológicos encontrados dentro de *Myloplus schomburgkii* utilizando o gene COI e Região Controle do DNA mitocondrial no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam o mesmo grupo biológico. **Ne**: rio Negro; **Bra**: rio Branco; **Nha**: rio Nhamundá; **Tap**: rio Tapajós; **Xin-Ara**: rios Xingu-Araguaia.

Myleus setiger

O alinhamento das 26 sequências concatenadas de *M. setiger*, sendo seis do Xingu, cinco do Tapajós, cinco do Tocantins-Araguaia, seis do rio Branco, uma do rio Aripuanã e quatro do rio Jari, rendeu 1050 pares de bases, dos quais 71 foram variáveis e 54 informativos para parcimônia. *Mylesinus paraschomburgkii* e *Myloplus schomburgkii* foram usados como grupo externo. O modelo de evolução molecular que melhor se ajustou ao banco de dados foi HKY+G. O método de inferência bayesiana indicou quatro grupos: (1) grupo rio Branco; (2) grupo rio Tapajós; (3) grupo Xingu/Araguaia e (4) grupo Pitinga/Aripuanã (Figura 12). O grupo rio Branco foi formado apenas por indivíduos coletados na bacia deste rio (N=6), assim como o grupo rio Tapajós que foi composto apenas por indivíduos dessa bacia (N=5). O grupo Xingu/Araguaia foi composto por indivíduos coletados nesses dois rios, e por dois indivíduos coletados no rio Jari, os quais se mostraram mais relacionados com os haplótipos do rio Araguaia (N=13). E o grupo Pitinga/Aripuanã foi composto por apenas três indivíduos, sendo dois do rio Pitinga e um do rio Aripuanã. A análise de Máxima Verossimilhança resultou na mesma topologia, no entanto os valores de suporte dos grupos ficaram abaixo de 90%.

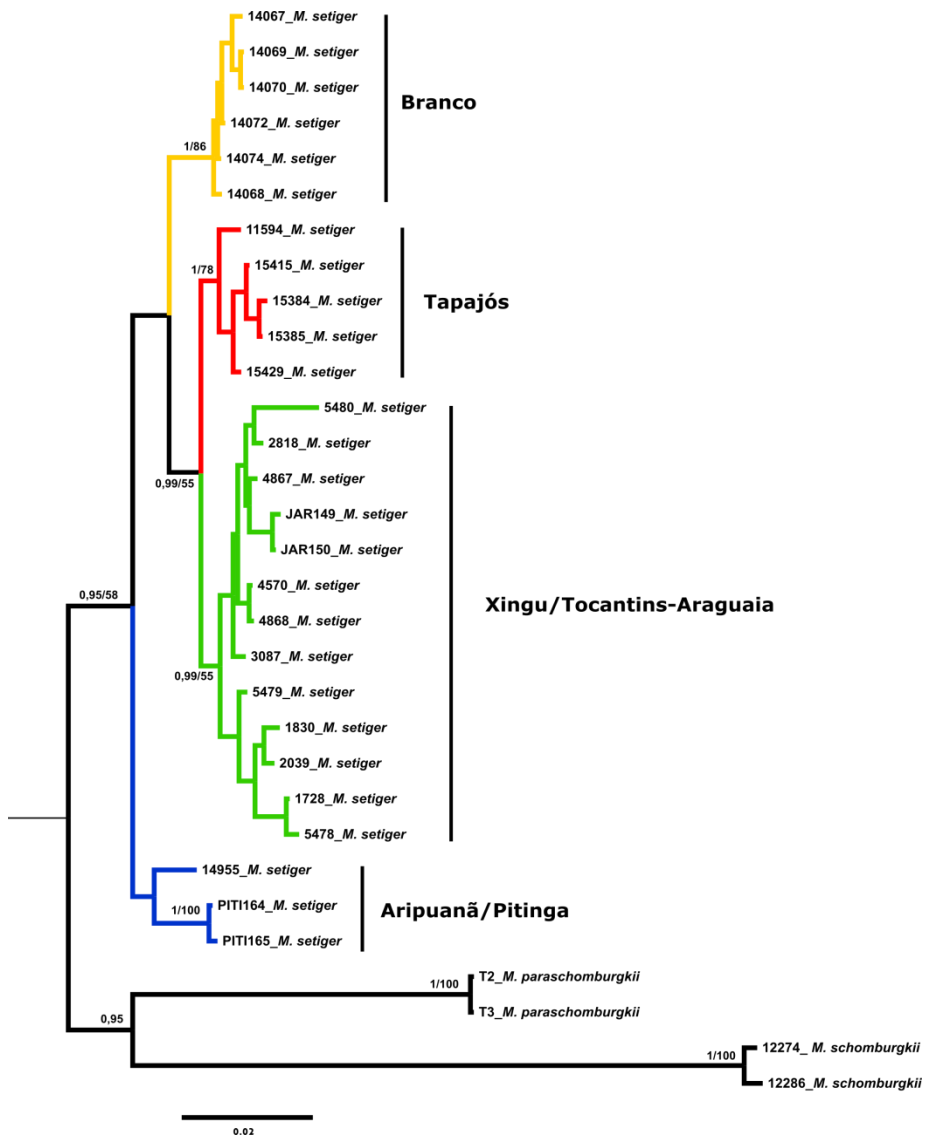


Figura 12. Relações filogenéticas dos haplótipos COI e Dloop de *Myleus setiger*. Topologia gerada por inferência bayesiana com valores estatísticos expressos em probabilidade posterior e *bootstrap* (máxima verossimilhança), respectivamente. As cores dos ramos correspondem às linhagens encontradas nesse táxon.

O número de haplótipos entre as localidades variou de um (rio Aripuanã) a cinco (rios Xingu e Tapajós). Das 26 sequências de *M. setiger*, foram encontrados 23 haplótipos únicos os quais não foram compartilhados entre as localidades analisadas, mostrando que cada bacia de drenagem abriga haplótipos exclusivos (Figura 13).

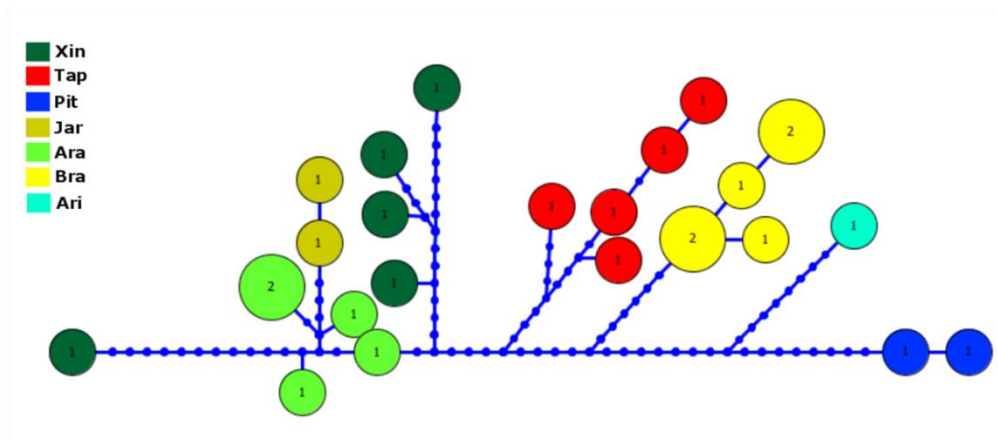


Figura 13. Redes de haplótipos com o gene COI e Região Controle mitocondrial representando as dispersões de *Myleus setiger* entre as bacias hidrográficas do Amazonas.

A estrutura genética das populações de *M. setiger* foi avaliada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA), e os resultados mostraram uma forte evidência de isolamento entre todas as populações analisadas, com valor de $\Phi_{ST} = 0.7018$ ($p=0.000$), mostrando que a maior parte da variação genética ocorre entre as populações desse táxon. Esses resultados são corroborados pelas estimativas par a par do Φ_{ST} após correção de Bonferroni, onde os valores de P foram significativos entre todas as localidades (Tabela 5). Para essa análise, as amostras de *M. setiger* do Araguaia, Tocantins e Jari foram agrupadas em uma única população devido ao baixo tamanho amostral em cada bacia, e também com base nos resultados da análise Bayesiana. O mesmo procedimento foi adotado para as amostras dos rios Pitinga e Aripuanã, que compuseram uma única população.

Tabela 5. Valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas para as sequências concatenadas do gene COI e da Região Controle de *Myleus setiger*. Valores significativos de $P < 0,002$ em negrito.

	Tapajós	Xingu	Toc_Ara	Branco	Pitinga
Tapajós	--				
Xingu	0.5136	--			
Toc_Ara	0.6632	0.3777	--		
Branco	0.8507	0.7473	0.8538	--	
Pitinga	0.6948	0.5945	0.7388	0.8000	--

O resultado da análise dos agrupamentos biológicos (BAPS) determinou quatro grupos biológicos ($\ln = -798.8589$) dentro de *M. setiger*, com as localidades do rio Xingu e Tocantins-Araguaia compartilhando o mesmo grupo, assim como as localidades do rio Pitinga e rio Aripuanã que também compartilharam o mesmo grupo biológico. As localidades de rio Tapajós e rio Branco apresentaram grupos biológicos exclusivos de suas bacias (Figura 14).

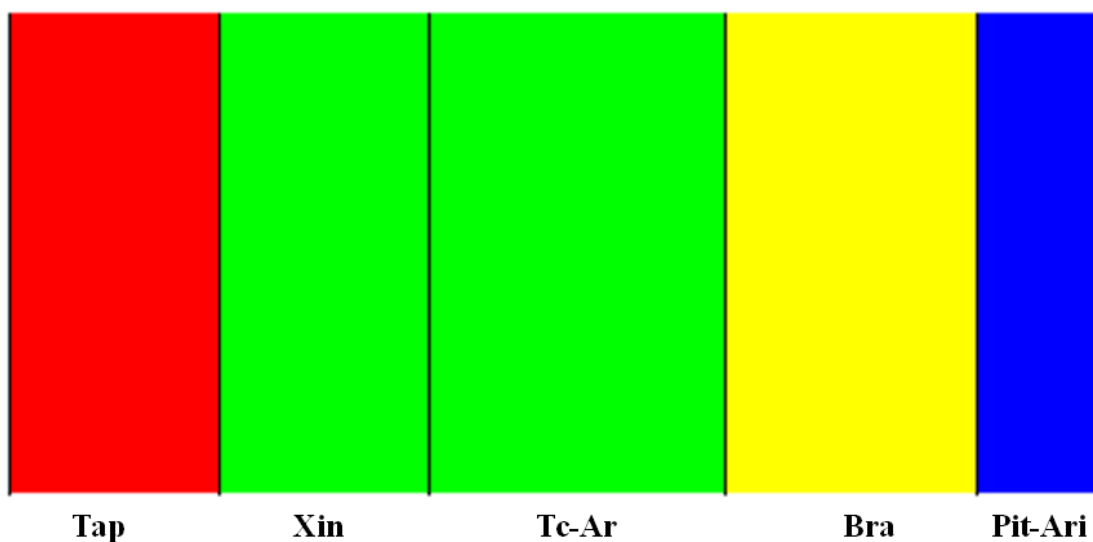


Figura 14. Grupos biológicos encontrados dentro de *Myleus setiger* utilizando o gene COI e Região Controle do DNA mitocondrial no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam o mesmo grupo biológico. **Tap**: rio Tapajós; **Xin**: rio Xingu; **Tc-Ar**: rios Tocantins-Araguaia; **Bra**: rio Branco; **Pit-Ari**: Pitinga-Aripuanã.

Tempo de divergência das linhagens de Serrasalminidae

Todos os valores ESS (Effective Sample Size) checados no programa Tracer v.1.5.0 foram maiores que 260, o que permite assegurar que os parâmetros do modelo de evolução molecular e as estimativas de tempo de divergência entre os linhagens são confiáveis, considerando nossa amostragem. Os resultados do BEAST, assumindo um relógio molecular relaxado não correlacionado, mostraram que o processo de diversificação das piranhas carnívoras (piranhas verdadeiras) é mais recente (aproximadamente 38 Ma) que a diversificação dos pacus do grupo *Myleus* (40 Ma).

Dentro do grupo das piranhas, a separação dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* ocorreu no médio Mioceno há cerca de 16 milhões de anos atrás. A partir do final do Mioceno (cerca de seis milhões de anos) inicia-se o processo de divergência dentro de *S. rhombeus* quando as populações do rio Tocantins-Araguaia e alto Xingu se separam das demais populações desse táxon. A separação das linhagens de *S. rhombeus* do Tocantins-Araguaia daquela encontrada no alto rio Xingu é datada em aproximadamente quatro milhões (3,98 Ma) já no Plioceno, enquanto a separação da linhagem do rio Orinoco parece ter iniciado a menos de um milhão de anos (923 mil anos) no Pleistoceno. A diversificação dentro de *Pygocentrus nattereri* iniciou um pouco mais tarde, há cerca de três milhões de anos, no final do Plioceno, com a separação das populações do Amazonas e Guaporé daquelas ocorrendo nos rios Tocantins-Araguaia e no rio São Bento no Maranhão. Ainda no Plioceno, a aproximadamente dois milhões a população de *P. nattereri* do alto Madeira (Guaporé) inicia o processo de separação das populações do Amazonas (Figura 15).

Dentro do grupo dos pacus, a separação entre *Myloplus schomburgkii* e *Myleus setiger* ocorreu no Oligoceno tardio, a aproximadamente 29 milhões de anos, enquanto o processo de separação das linhagens dentro dessas espécies teve início no final do Mioceno nos últimos seis milhões de anos. A divergência das linhagens de *M. schomburgkii* data de aproximadamente cinco milhões de anos (4,9 Ma) no início do Plioceno. Para *M. setiger* o processo de diversificação de suas populações teve início mais cedo no final do Mioceno, cerca de seis milhões de anos atrás com a separação da linhagem Pitanga/Aripuanã. As divergências subsequentes foram a separação da linhagem do rio Branco (5,2 Ma) no início do Plioceno, seguida pela

separação da linhagem do rio Tapajós (3,5 Ma) no final do Plioceno, e mais recente a separação entre Xingu e Araguaia (2,4 Ma) também no final do Plioceno (Figura 15).

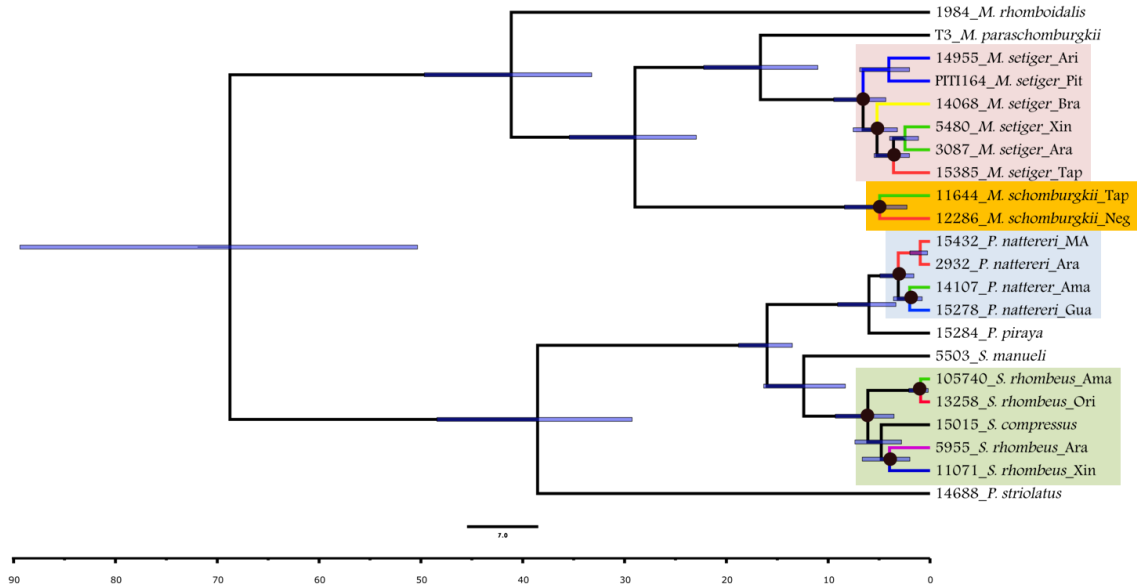


Figura 15. Hipóteses de tempo de divergência molecular entre as linhagens de Serrasalminae. Estimativas foram calibradas em 17 milhões de anos (Ma) para as piranhas (tempo de separação dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*) e 28 milhões de anos (Ma) para os pacus (tempo de separação de *Myloplus schomburgkii* e *Myleus setiger*). Retângulo verde, linhagens dentro de *Serrasalmus rhombeus*; azul, linhagens dentro de *Pygocentrus nattereri*; laranja, linhagens dentro de *Myloplus schomburgkii*; rosa, linhagens dentro de *Myleus setiger*. As bolinhas pretas nos nós indicam o tempo de divergência molecular em Ma entre as linhagens, e as barras azuis o desvio padrão. Cores diferentes nos ramos indicam linhagens diferentes para cada táxon.

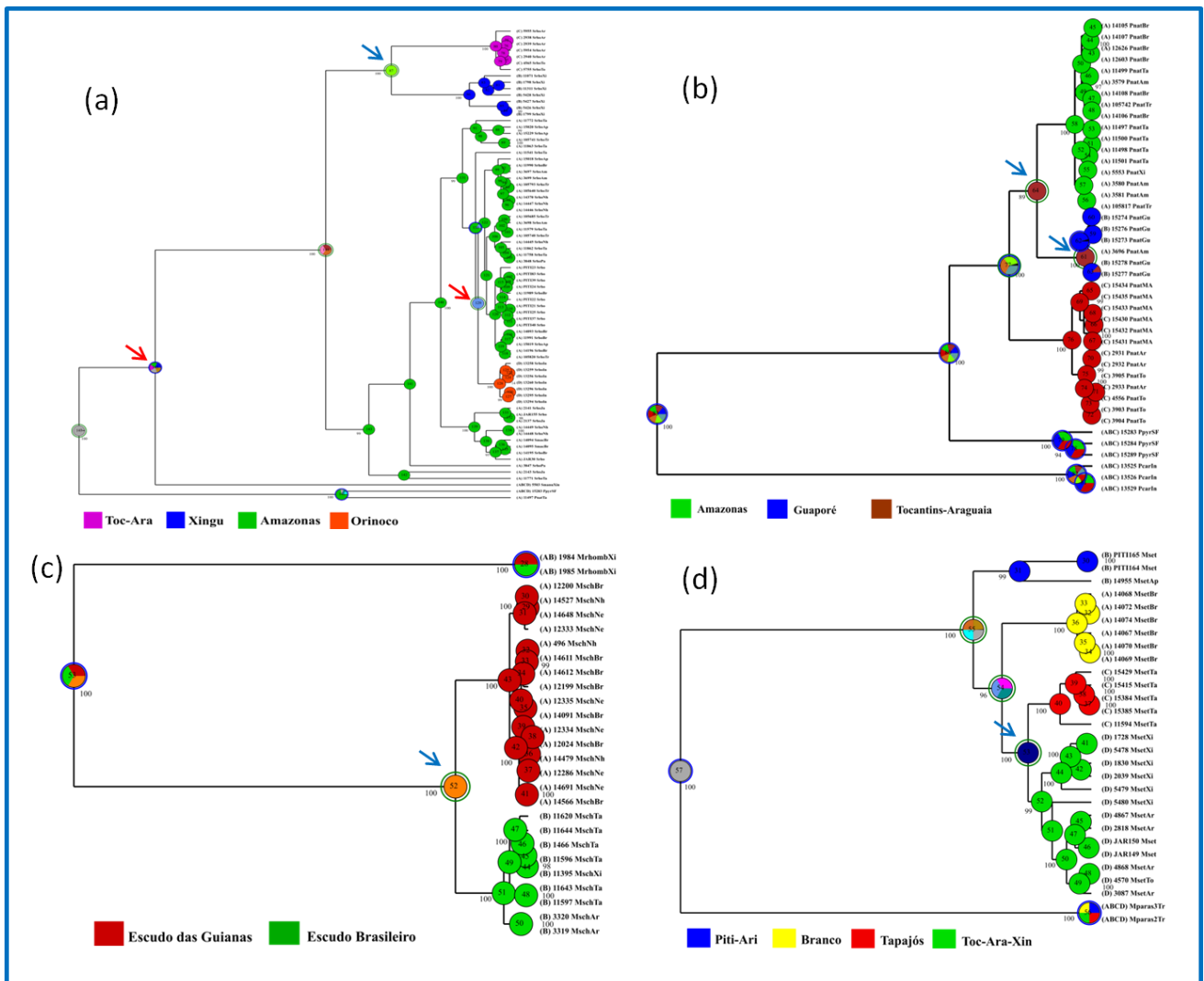


Figura 16. História biogeográfica das espécies de Serrasalmidae inferida através da análise de Dispersão-Vicariância (S-DIVA). **(a)** *Serrasalmus rhombeus*, **(b)** *Pygocentrus nattereri*, **(c)** *Myloplus schomburgkii* e **(d)** *Myleus setiger*. Setas vermelhas indicam eventos de dispersão e setas azuis eventos vicariantes com probabilidade = ou > 0.95

Análises biogeográficas

A reconstrução biogeográfica de *Serrasalmus rhombeus* pela metodologia S-DIVA (Figura 16a) necessitou de um total de 12 eventos, sendo oito de dispersão e quatro eventos vicariantes. Tal análise reconstruiu como área ancestral as áreas da planície amazônica de onde esse táxon começou a dispersar para outras áreas a cerca de seis milhões de anos. A análise mostra que o alto Xingu e a bacia do Tocantins-Araguaia começaram a ser colonizados por *S. rhombeus* há cerca de quatro milhões de anos, enquanto a colonização do Orinoco por esse táxon ocorreu a menos de um

milhão de anos atrás. Ainda de acordo com os resultados de S-DIVA, *S. rhombeus* do Tocantins-Araguaia e do alto Xingu se separaram por vicariância no Plioceno (3,9 Ma), o mesmo ocorrendo com *S. rhombeus* do Orinoco que separou do Amazonas a cerca de 900 mil anos no Pleistoceno.

Para o gênero *Pygocentrus*, S-DIVA (Figura 16b) necessitou de um total de 19 eventos, sendo 16 de dispersão e três eventos vicariantes para a reconstrução biogeográfica desse táxon. Nessa análise foram incluídas: *P. nattereri*, da bacia do Amazonas; *P. cariba* da bacia do rio Orinoco e *P. piraya* da bacia do rio São Francisco. A metodologia reconstruiu como área ancestral a bacia do rio Orinoco, de onde esse táxon dispersou para as outras áreas na América do Sul no final do Mioceno há cerca de seis milhões de anos. As linhagens de *P. nattereri* separaram por dispersão dentro da bacia Amazônica e bacia do Tocantins-Araguaia no Plioceno há cerca de três milhões de anos. A análise também recuperou dois eventos vicariantes durante a dispersão de *P. nattereri* na Amazônia, os quais separam as linhagens do Amazonas e Guaporé há mais ou menos um milhão de anos, no Pleistoceno.

A reconstrução biogeográfica de *Myloplus schomburgkii* necessitou de quatro eventos (três de dispersão e um de vicariância). A área ancestral reconstruída para esse táxon corresponde à área do escudo Brasileiro, com separação da linhagem dessa área daquela do escudo Guianense ocorrendo por vicariância há cerca de cinco milhões de anos (4,9 Ma), no início do Plioceno (Figura 16c).

Para *Myleus setiger* vários eventos de dispersão e vicariância moldaram a distribuição desse táxon na bacia amazônica. A área ancestral reconstruída foi a área de distribuição da espécie com pelo menos três eventos vicariantes separando as linhagens. Primeiro evento vicariante separou *M. setiger* do Pitinga/Aripuanã das demais localidades há aproximadamente 6,5 milhões de anos atrás no final do Mioceno. Durante o Plioceno, populações de *M. setiger* se estabelecem nas drenagens do rio Branco e rio Tapajós como resultado de vicariância (Figura 16d).

DISCUSSÃO

Análises genéticas populacionais e filogeográficas com marcadores moleculares constituem uma ferramenta poderosa que pode ajudar a elucidar questões relativas à estruturação de populações de diversas espécies de organismos, tais como origem, taxas de divergências genéticas, migração, tamanhos da população, seleção natural e eventos históricos (SUNNUCKS, 2000).

Neste estudo nós usamos o gene CO1 e a Região Controle do DNA mitocondrial para analisar comparativamente a estrutura populacional e a diversificação de *S. rhombeus*, *P. nattereri*, *M. schomburgkii* e *M. setiger* na bacia Amazônica. Esses peixes Characiformes pertencem à família Serrasalminidae com ampla distribuição nas principais bacias hidrográficas da América do Sul, e constituem um importante recurso econômico para a região.

Estrutura populacional das piranhas Serrasalmus rhombeus e Pygocentrus nattereri na bacia Amazônica

Serrasalmus rhombeus e *P. nattereri* fazem parte do grupo das piranhas dentro da família Serrasalminidae e tem uma distribuição mais ampla de suas populações dentro do continente Sul-Americano, quando comparadas aos pacus do grupo *Myleus*. Esses táxons apresentaram padrão similar de estrutura populacional com linhagens altamente estruturadas dentro da bacia do rio Tocantins-Araguaia. Ambas apresentaram haplótipos exclusivos nessas bacias, sendo que *S. rhombeus* foi mais diversa apresentando três haplótipos, enquanto *P. nattereri*, apresentou apenas um haplótipo. Embora a distância genética observada entre as populações das piranhas tenha sido baixa (em média 1% para *P. nattereri* e 1,5% para *S. rhombeus*), a análise bayesiana de agrupamentos mostra claramente um grupo biológico exclusivo dessa bacia para cada uma das espécies de piranha (Figuras 5 e 8).

Ambas as espécies apresentaram ainda linhagens divergentes em outras bacias. *Serrasalmus rhombeus* apresentou uma linhagem tão divergente quanto aquela encontrada na bacia do rio Tocantins-Araguaia, na porção alta da bacia do rio Xingu. Esta linhagem apresentou uma divergência genética menor em relação à linhagem do Tocantins-Araguaia, no entanto não houve compartilhamento de haplótipos com nenhuma outra localidade, confirmando que o alto rio Xingu abriga

um grupo biológico de *S. rhombeus* exclusivo. *Pygocentrus nattereri* apresentou uma segunda linhagem na bacia do rio Guaporé, no entanto esta compartilhou haplótipo com a população do rio Amazonas, de quem foi menos divergente. Embora essa linhagem apresente baixa diversidade haplotípica (apenas dois haplótipos), a mesma não se encontra isolada na bacia do rio Guaporé, uma vez que o grupo biológico observado nessa localidade é compartilhado com a localidade de Maués no rio Amazonas (Figura 8).

A estruturação genética observada entre as populações de *S. rhombeus* e *P. nattereri* foi corroborada pelos resultados da AMOVA, a qual evidenciou alto grau de estruturação genética entre as populações, o que foi confirmado pelos significativos valores de P ($p=0,000$) em todas as comparações que envolveram a localidade do rio Tocantins-Araguaia (para ambas as espécies), o alto rio Xingu (para *S. rhombeus*) e rio Guaporé (para *P. nattereri*).

Estruturação de populações de espécies de peixes na bacia do rio Tocantins-Araguaia parece ser um efeito da separação desse sistema de drenagem da bacia Amazônica que é postulado ter finalizado há cerca de 1,8 milhões de anos atrás, no fim do Plioceno (ROSSETTI & VALERIANO, 2007). Alguns trabalhos têm sugerido que táxons compartilhados pelas duas bacias podem representar espécies, unidades evolutivas ou unidades de manejo diferentes. AMARAL *et al.* (2013), analisando as espécies do gênero *Colomesus*, encontraram uma população dessa espécie altamente estruturada na bacia do alto rio Tocantins. Evidências genética e morfológica levaram os autores a descrever uma nova espécie desse gênero para a bacia do Tocantins-Araguaia, *Colomesus tocantinensis*. Analisando a variabilidade genética de *Prochilodus nigricans* na bacia Amazônica, MACHADO (2009) encontrou a população da bacia do rio Tocantins-Araguaia fortemente estruturada com respeito ao DNA mitocondrial, e sugere que essa população seja na verdade, outra espécie de *Prochilodus*. Recentemente, MATEUSSI, PAVANELLI, OLIVEIRA, (2016), em uma análise taxonômica integrativa das espécies do gênero *Mylossoma*, definiram quatro Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) dentro de *M. duriventre*, sendo uma delas exclusiva da bacia do rio Tocantins-Araguaia. Outros táxons compartilhados pelas bacias do Amazonas e Tocantins-Araguaia apresentaram linhagens divergentes dentro desta última. Este foi o caso para a tartaruga *Podocnemis expansa* (PEARSE *et al.*, 2006), e para o boto vermelho, do gênero *Inia*, cuja única espécie reconhecida recentemente foi subdividida em uma nova espécie

para essa bacia, *Inia araguaiaensis* (HRBEK *et al.*, 2014). HUBERT *et al.* (2007) analisando a diversificação das espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* nas principais bacias hidrográficas da América do Sul, encontraram *S. rhombeus* do Tocantins-Araguaia como uma linhagem mais basal desse táxon e sugerem que a diversificação dessa espécie para o alto Amazonas e Planalto das Guianas se deu a partir daí. Nossos resultados para *S. rhombeus* são congruentes com aqueles obtidos pelos autores acima citados, no sentido de ser uma população bem divergente em relação às demais, no entanto, são discordantes em relação a área ancestral desse táxon, uma vez que nossos resultados mostram que *S. rhombeus* dispersou a partir da Planície Amazônica para as demais áreas.

Populações de peixes estruturadas nas porções altas das bacias de drenagem normalmente estão associadas com a presença de barreiras físicas presentes nesses sistemas. Geralmente, essas áreas mais altas das bacias apresentam, com maior frequência, alterações verticais no curso das drenagens e isolamentos físicos e ecológicos impostos pelo relevo. Estas alterações permitem o abrigo de uma fauna isolada nessas áreas (LIMA & RIBEIRO, 2011). Observamos em nossos resultados que, *Serrasalmus rhombeus* e *P. nattereri* apresentaram populações estruturadas nas porções altas do rio Xingu e Madeira (Guaporé) respectivamente.

O rio Xingu possui ao longo de seu curso vários trechos de cachoeiras e corredeiras, sendo o maior deles um impressionante trecho compreendido entre a cidade de Altamira e a foz desse rio, conhecido como Volta Grande do Xingu. De acordo com GOULDING *et al.* 2003 essa grande área de corredeiras é barreira à migração de vários organismos aquáticos, inclusive peixes. Ainda de acordo com estes autores, espécies de peixes que ocorrem acima e abaixo dessas corredeiras são notadamente diferentes. É o caso das populações da arraia de água doce *Paratrygon aireba*. FREDERICO *et al.* (2012), investigando a distribuição da diversidade genética desse táxon na bacia Amazônica, observaram a ocorrência de três grupos distintos dentro da bacia: um ocorrendo no sistema Solimões-Amazonas e rio Negro, outro grupo na bacia do rio Araguaia e outro no rio Xingu, o qual é grupo irmão do primeiro.

O rio Madeira também possui uma série de corredeiras ao longo de um trecho de mais de 300 km localizado entre a cidade de Guajará Mirim (na bacia do rio Mamoré) e a cidade de Porto Velho no rio Madeira, e é conhecidamente um divisor de fauna nessa bacia (TORRENTE-VILARA *et al.*, 2011). Vários trabalhos

evidenciam estruturação genética nas populações de peixes que ocorrem acima e abaixo das corredeiras do rio Madeira, como aquele realizado por FARIAS *et al.* (2010) com *Colossoma macropomum*, o tambaqui. Embora os autores concluam que essas corredeiras não são uma barreira efetiva as trocas populacionais entre a bacia do Amazonas e as drenagens do alto rio Madeira, os mesmos observaram uma maior migração de descida nesse rio, muito provavelmente empreendida por larvas e juvenis de tambaqui transportados passivamente para áreas de berçário na bacia do Amazonas. *Prochilodus nigricans*, outro Characiforme migrador da bacia amazônica, apresenta populações estruturadas na bacia do alto rio Madeira como efeito da presença dessas corredeiras (MACHADO, 2009).

Serrasalmus rhombeus e *P. nattereri* são as espécies de piranha com distribuição mais ampla na América do Sul, ocorrendo em todas as principais bacias hidrográficas desse continente. Mas, apesar dessa ampla distribuição, esses peixes são comumente encontrados nas áreas de planície e nas porções baixas dos rios drenando os escudos (FREEMAN *et al.*, 2007). Nessas áreas, ocupam os mais diversos ambientes, onde empreendem pequenos movimentos migratórios geralmente relacionados a forrageio e reprodução das espécies (JÉGU & KEITH, 1999; COHEN *et al.*, 1999). Esse comportamento mais territorialista das piranhas poderia justificar a estruturação genética observada nas populações desses peixes nas porções altas dos tributários do Amazonas que apresentam barreiras ao longo de seus cursos, uma vez que estruturação das populações de *S. rhombeus*, por exemplo, já foi observada entre as drenagens da planície do alto rio Madeira aparentemente sem barreiras físicas (HUBERT *et al.*, 2007), o que evidencia o comportamento não migrador desses peixes.

Nossos resultados, portanto mostram que as piranhas *S. rhombeus* e *P. nattereri* não se comportam como populações panmíticas dentro de suas áreas de ocorrência, evidenciando a presença de populações de *S. rhombeus* estruturadas na bacia do rio Tocantins-Araguaia e no alto rio Xingu, assim como populações de *P. nattereri* estruturadas nas bacias dos rios Tocantins-Araguaia e rio São Bento no Maranhão, e também no alto Madeira (bacia do rio Guaporé).

Estrutura populacional dos pacus Myloplus schomburgkii e Myleus setiger na bacia Amazônica

Myloplus schomburgkii e *Myleus setiger* fazem parte do grupo *Myleus*, um grupo de pacus estritamente herbívoros, os quais são mais relacionados com ambientes de águas pretas e claras de rios que drenam as regiões dos escudos na América do Sul. Esse grupo de Serrasalmídeos apresenta os táxons mais especializados dentro da família, com algumas espécies alimentando-se quase que exclusivamente de plantas Podostemaceae que são abundantes nas áreas de cachoeiras e corredeiras dos rios amazônicos (JÉGU & SANTOS, 2002; SANTOS *et al.*, 1997).

As duas espécies de pacu, a exemplo das piranhas, também apresentaram populações bem estruturadas dentro da área amostrada. No entanto, o padrão de estruturação dos táxons foi diferente. Enquanto *M. schomburgkii* apresentou duas linhagens bem divergentes uma em cada escudo, *M. setiger* apresentou quatro grupos bem definidos dentro da área amostrada, com um padrão de distribuição das linhagens por bacia hidrográfica. Uma linhagem exclusiva na bacia do rio Branco, outra exclusiva do rio Tapajós, uma linhagem compartilhada pelos rios Pitinga (escudo das Guianas) e rio Aripuanã (escudo Brasileiro), e uma quarta com ocorrência nas bacias dos rios Xingu, Tocantins-Araguaia (escudo Brasileiro) e rio Jari (escudo das Guianas). Essas espécies foram as mais contundentes em demonstrar linhagens divergentes, evidenciadas nos altos índices de fixação (*F_{ST}*), falta de compartilhamento de haplótipos, forte monofilia recíproca, e uma grande separação por vários passos mutacionais entre grupos de haplótipos entre localidades.

O grupo *Myleus* é o mais problemático do ponto de vista taxonômico dentro da família Serrasalmidae, com pelo menos quatro dos seis gêneros desse grupo apresentando indefinições no posicionamento filogenético de seus táxons (parafilia). De acordo com GÉRY (1977), a dificuldade em separar os membros desse grupo em unidades taxonômicas viáveis está relacionada principalmente a sobreposição de seus caracteres merísticos e morfológicos, o que dificulta qualquer tentativa de investigação de suas populações, uma vez que os limites interespecíficos não podem ser estabelecidos.

Dentro desse grupo, os gêneros *Myloplus* e *Myleus*, aos quais pertencem respectivamente *M. schomburgkii* e *M. setiger*, são os que apresentam as espécies de pacus herbívoros com distribuição mais ampla. Os demais gêneros (*Mylesinus*, *Tometes*, *Ossubtus* e *Utiaritchthys*) no geral possuem espécies endêmicas, restritas as áreas de corredeiras das drenagens dos escudos (JÉGU & SANTOS, 2002;

ANDRADE, JÉGU, GIARRIZZO, 2016; PEREIRA & CASTRO, 2014). Embora, como já colocado anteriormente, esse grupo apresente incertezas taxonômicas, as duas espécies analisadas nesse estudo são morfologicamente distinguíveis de suas congêneres sendo relativamente fáceis de identificar.

Myloplus schomburgkii e *M. setiger* ocorrem simpatricamente nas principais drenagens dos escudos brasileiro e guianense onde o primeiro parece ocorrer nas áreas mais calmas dos rios enquanto o segundo é encontrado principalmente em áreas de cachoeiras e corredeiras desses rios, onde a movimentação das águas é mais forte. O padrão de separação de linhagens apresentado por ambos os táxons parece refletir exatamente o habitat ocupado por essas espécies. As populações de *M. schomburgkii* parecem estar sendo separadas pelas águas brancas e carregadas de sedimento do sistema Solimões-Amazonas, onde essa espécie é ausente. *Myleus setiger* por ser mais reofílico (JÉGU & SANTOS, 2002), com hábito alimentar especializado, apresentou um maior número de populações estruturadas e com divergência intraespecífica considerável (em média 2,08%).

A distribuição das populações de *Myleus setiger* é congruente com a distribuição das espécies dos outros gêneros de pacus do grupo *Myleus*, os quais apresentam espécies endêmicas nas principais bacias de drenagem dos escudos. Por exemplo, o gênero *Tometes* possui atualmente seis espécies (ANDRADE, JÉGU, GIARRIZZO, 2016), distribuídas nas drenagens do escudo das Guianas e escudo Brasileiro, e espécies endêmicas nas bacias dos rios Trombetas, Xingu e Tocantins. O mesmo ocorre com as espécies do gênero *Mylesinus*, o qual possui três espécies (JÉGU & DOS SANTOS, 1988), uma endêmica do rio Essequibo (*Mylesinus schomburgkii*), outra endêmica do Tocantins-Araguaia (*M. paucisquamatus*) e a terceira restrita às drenagens do escudo das Guianas (*M. paraschomburgkii*), a qual apresenta forte diferenciação no nível molecular entre as bacias dos rios Jari, Trombetas e Uatumã (PORTO, 1999).

Estudos populacionais das espécies de Serrasalmídeos são raros, salvo para algumas espécies de importância econômica como *Colossoma macropomum* (SANTOS, RUFFINO, FARIAS, 2007), e *Piaractus brachypomus* (ESCOBAR *et al.*, 2015). Para os pacus do grupo *Myleus* existe apenas um trabalho não publicado (PORTO, 1999), o qual analisa as populações de *Mylesinus paraschomburgkii* das drenagens do escudo das Guianas.

A evolução dos táxons de Serrasalmidae na bacia amazônica apresentou um padrão de dispersão da planície em direção às drenagens mais altas dos escudos. Foram observadas populações diferenciadas nas porções altas dos rios Xingu e Madeira para as piranhas, possivelmente como efeito da presença de barreiras físicas no curso desses rios, assim como populações de piranhas diferenciadas também na bacia dos rios Tocantins-Araguaia, provavelmente como efeito da separação dessa bacia do centro de dispersão dessas espécies, ou seja, a planície amazônica. Os pacus, cuja distribuição é mais restrita as áreas dos escudos, apresentaram padrões diferentes de separação das linhagens. Enquanto a distribuição de *Myloplus schomburgkii* parece ser interrompida pelo sistema Solimões-Amazonas segregando uma linhagem em cada escudo, *Myleus setiger* parece se diferenciar nas principais drenagens dentro dos escudos, em razão de seu estilo de vida reofílico e sua especialização trófica.

Embora os padrões de diversificação tenham sido discordantes, o que era esperado entre piranhas e pacus, a diversificação desses táxons ocorreu de forma concomitante a partir de aproximadamente seis milhões de anos atrás no Plioceno, com muitos eventos de dispersão e vicariância moldando a distribuição desses peixes na Amazônia. No entanto, vicariância parece ter sido o fator mais importante na separação das linhagens.

Serrasalmus rhombeus e *Pygocentrus nattereri* apresentaram padrão semelhante de diversificação de suas linhagens dentro da área amostrada, no entanto foram discordantes do padrão apresentado pelos pacus *Myloplus schomburgkii* e *Myleus setiger*. Essa diferença na distribuição das linhagens desses Serrasalmídeos parece estar relacionada principalmente a seus estilos de vida e a forma com que esses táxons responderam a dinâmica dos eventos que moldaram sua distribuição na Amazônia.

As piranhas *Serrasalmus rhombeus* e *Pygocentrus nattereri* apresentaram linhagens divergentes dentro da bacia do rio Tocantins-Araguaia. O tempo de separação dessas linhagens de aproximadamente três milhões de anos coincide com o tempo de formação da atual configuração do baixo Amazonas, quando o rio Tocantins teve seu baixo curso desviado pra leste passando a desaguar dentro do rio

Pará, separando-se assim da bacia Amazônica (ROSSETTI & VALERIANO, 2007). De acordo com JÉGU & KEITH (1999), essa área de águas salobras da foz do rio Amazonas se constitui em um ambiente inóspito para algumas espécies de Serrasalmidae, e pode ser uma barreira a dispersão desses táxons entre essas bacias.

Serrasalmus rhombeus apresentou ainda, uma linhagem divergente na porção alta do rio Xingu com um tempo de separação de aproximadamente quatro milhões de anos. A presença de corredeiras no curso desse rio é considerada uma barreira efetiva a migração de peixes, isolando populações na porção alta dessa bacia (GOULDING *et al.*, 2003), a qual é considerada uma área de endemismo de muitos táxons da ictiofauna amazônica, inclusive do Serrasalmídeo *Ossubtus xinguensis* (ZUANON, 1999). Os mecanismos responsáveis pela diferenciação das linhagens e pelo alto grau de endemismo no rio Xingu ainda não são muito claros, mas alguns autores atribuem esse padrão às flutuações no nível do mar no Plio-Pleistoceno (SOLOMON *et al.*, 2008; HUBERT & RENNO, 2006). De acordo com HUBERT & RENNO (2006), as incursões marinhas podem ter isolado linhagens de peixes nos trechos altos dos rios onde estas teriam se diversificado. Com a regressão marinha esses táxons teriam dispersado de volta para a planície. A separação de *S. rhombeus* nessa bacia é coincidente com essa teoria, no entanto não observamos nenhum evento de dispersão do alto Xingu para a planície em nossas análises.

Pygocentrus nattereri também apresentou uma linhagem isolada na bacia do rio Guaporé (alto rio Madeira), com um tempo de separação de aproximadamente um milhão e novecentos mil anos. Populações de outros Serrasalmídeos isoladas nessa área também já foram encontradas por HUBERT *et al.* (2007). Nesse trabalho, os autores postulam que as populações de *S. rhombeus* das drenagens do alto rio Madeira são derivadas de populações de áreas estáveis do escudo Brasileiro, as quais teriam funcionado como áreas de refúgios para os peixes durante as flutuações climáticas do Pleistoceno. Padrões similares foram observados para o tucunaré (*Cichla*) (RENNO *et al.*, 2006) e para peixes do gênero *Leporinus* na Guiana Francesa (RENNO *et al.*, 1991). Nossos resultados com *P. nattereri* são congruentes com aqueles encontrados para *S. rhombeus*, onde esses peixes parecem ter colonizado as baixas drenagens do alto rio Madeira nos últimos quatro milhões de anos que é o tempo postulado para a colonização dessas drenagens (WILLIS *et al.*, 2007; HUBERT *et al.*, 2007).

Enquanto a diversificação das piranhas parece estar mais relacionada a dispersão e posterior isolamento em áreas mais altas das drenagens amazônicas, a diversificação dos pacus parece estar mais associada a dispersão dentro das drenagens dos escudos, com populações estruturadas provavelmente devido a especializações desses táxons em ambientes específicos, como áreas de corredeiras nesses rios.

As populações de *Myloplus schomburgkii* analisadas nesse estudo se mostraram estruturadas, com linhagens diferenciadas em cada escudo. O tempo de separação dessas linhagens de aproximadamente 5 milhões de anos é coincidente com a formação do rio Amazonas que é postulado por HOORN *et al.* (2010) ter ocorrido entre 10 e sete milhões de anos. As águas carregadas de sedimentos andinos do sistema Solimões-Amazonas parecem ser o principal mecanismo vicariante separando as populações de *M. schomburgkii*.

Myleus setiger, outra espécie de pacu analisado nesse trabalho, apresentou um maior número de linhagens comparado a *M. schomburgkii*, e a separação dessas linhagens parece ter ocorrido acompanhando a evolução do rio Amazonas, com a primeira delas separando há cerca de seis milhões e meio de anos atrás na bacia dos rios Uatumã no escudo das Guianas e rio Aripuanã no escudo Brasileiro. As linhagens mais recentemente separadas são aquelas dos rios Tocantins-Araguaia e Jari no extremo leste da bacia Amazônica. *Myleus setiger* é um pacu reofílico encontrado principalmente nos rios encachoeirados dos escudos (JÉGU & SANTOS, 2002). A diversificação desses peixes na Amazônia parece estar fortemente relacionada com os ambientes de corredeiras, onde sua principal fonte de alimentação, as plantas Podostemaceas, são abundantes.

A diversificação dos Serrasalmídeos na América do Sul teve início no final do Cretáceo, a cerca de 65 milhões de anos atrás (LUNDBERG, 1998), no entanto a maior parte de sua diferenciação no nível genérico ocorreu no Mioceno, com a maioria das espécies tendo surgido antes do Pleistoceno (ALBERT & REIS, 2011). Nosso trabalho corrobora esses resultados, uma vez que os táxons analisados aqui mostraram uma separação de suas linhagens ocorrendo principalmente no início do Plioceno para os pacus e final desse período para as piranhas. A evolução dessas linhagens na bacia Amazônica foi influenciada por vários processos, principalmente geológicos, que ocorreram nesse continente nos últimos seis milhões de anos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, J. S.; PETRY, P.; REIS, R. E. Major Biogeographic and Phylogenetic Patterns. In: ALBERT, J. S.; REIS, R. E. (Eds.). . **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**. University of California Press, 2011. p. 21–58.

AMARAL, C., BRITO, P. et al. A New Cryptic Species of South American Freshwater Pufferfish of the Genus *Colomesus* (Tetraodontidae), Based on Both Morphology and DNA Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

ANDRADE, M. C.; GIARRIZZO, T.; JÉGU, M. *Tometes camunani* (Characiformes : Serrasalminidae), a new species of phytophagous fish from the Guiana Shield , rio Trombetas basin , Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 297–306, 2013.

ANDRADE, M. C.; JÉGU, M.; GIARRIZZO, T. *Tometes kranponhah* and *Tometes ancyloirhynchus* (Characiformes: Serrasalminidae), two new phytophagous serrasalmids, and the first *Tometes* species described from the Brazilian Shield. **Journal of Fish Biology**, 2016.

APRIL, J.; MAYDEN, R. Genetic calibration of species diversity among North America 's freshwater fishes. **Proceedings of the ...**, v. 108, p. 10602–10607, 2011.

AVISE, J. C. *Molecular Markers , Natural History and evolution*. **Springer-Science+Business Media, B.V.**, 1994.

AVISE, J. C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University press, 2000.

AVISE, J.C. *The Hope, Hype, and Reality of Genetic Engineering*. Oxford University Press, New York. 2004.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2nd. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2005. v. 50

BATES, J. M.; HACKETT, S. J.; CRACRAFT, J. Area-relationships in the Neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of Passerine birds **Journal of Biogeography**, 1998.

BEHEREGARAY, L., SUNNUCKS, P., BRISCOE, D. A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. **Proceedings of The Royal Society**, v. 269, n. 1486, p. 65–73, 2002.

BENZAQUEM, D. C. et al. DNA Barcoding in Pencilfishes (Lebiasinidae : Nannostomus) Reveals Cryptic Diversity across the Brazilian Amazon. **PLoS ONE**, p. 1–14, 2015.

BERGSTEN, J. O. B. et al. The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. **Systematic biology**, v. 61, n. 5, p. 851–869, 2012.

- BIRSTEIN, V. J. et al. Testing taxonomic boundaries and the limit of DNA barcoding in the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. **Mitochondrial DNA**, v. 20, n. December, p. 110–118, 2009.
- BOHLKE, J.E.; WEITZMAN, S.H.; MENEZES, N.A. 1978. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazônica*, 8: 657-677.
- BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 8, p. 1767–1780, 1999.
- BUCKUP, P. A; MENEZES, N. A; GHAZZI, M. S. **Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil**. [s.l: s.n.].
- 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, n. 1, p. 135–53, jul. 2005.
- CASTRO PAZ, F. P.; BATISTA, J. D. S.; PORTO, J. I. R. DNA barcodes of rosy tetras and allied species (Characiformes: Characidae: Hypheosobrycon) from the Brazilian Amazon basin. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–8, 2014.
- CENTOFANTE, L.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. 2002a. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon basin. *Caryologia* 55(1): 37-45.
- CIONE, A. L. et al. *Megapiranha paranensis*, a new genus and species of Serrasalminae (Characiformes, Teleostei) from the upper Miocene of Argentina. *Journal of Vertebrate Paleontology* v. 29, p. 350–358, 2009.
- COOKE, G. M.; CHAO, N. L.; BEHEREGARAY, L. B. Phylogeography of a flooded forest specialist fish from central Amazonia based on intron DNA: the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*. **Freshwater Biology**, p. 1216–1232, 2009.
- CORANDER, J., CHENG, L. et al. *BAPS*: Bayesian Analysis of Population Structure. Manual v 6.0. **Bioinformatics**, p. 1–28, 2013.
- DARRIBA, D., TABOADA, G. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772–772, 2012.
- DE ALMEIDA-VAL, V. M. F. et al. LDH isozymes in amazon fish-III. Distribution patterns and functional properties in Serrasalminae (Teleostei: Ostariophysi). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, p. 119–125, 1992.
- DE CARVALHO, D. C. et al. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial DNA**, v. 22, n. October, p. 80–86, 2011.
- DE OLIVEIRA RIBEIRO, A. et al. DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 6, p. 1012–1020, 2012.

DESALLE, R.; EGAN, M. G.; SIDDALL, M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1905–16, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 1987.

DRUMMOND, A., HO, S. et al. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLoS Biology**, v. 4 n. 5, p. 699-710, 2006.

DRUMMOND, A., RAMBAUT, A. *BEAST*: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC evolutionary biology**, v. 7 n. 1, p. 214, 2007.

EIGENMANN, C. H. The Serrasalminae and Mylinae. *Annals of the Carnegie Museum*, 9(3-4): 226-272, pls. 44-58, 1915.

ESCHMEYER, W. N., FONG, J. D. *Catalog of Fishes*. San Francisco: **California Academy of Sciences**. 2016.

ESCOBAR L., M. D. et al. Delimiting Evolutionarily Significant Units of the Fish, *Piaractus brachypomus* (Characiformes: Serrasalminidae), from the Orinoco and Amazon River Basins with Insight on Routes of Historical Connectivity. **Journal of Heredity**, v. 106, n. S1, p. 428–438, 2015.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P., QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p.479-491, 1992.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p.47-50, 2005.

FARIAS, I. P.; HRBEK, T. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 1, p. 32–43, 2008.

FARIAS, I.P., TORRICO, J.P. et al. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon Basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 56: 1129–1135, 2010.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the Comparative Method. **The American Naturalist**, v. 125, p. 1–15, 1985.

FIGUEIREDO, J. et al. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. **Geology**, v. 37, n. 7, p. 619–622, 2009.

FREDERICO, R. G. et al. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle , 1841 (Chondrichthyes :

Potamotrygonidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 71–80, 2012.

FREEMAN, B. et al. Molecular systematics of Serrasalminae: Deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. **Zootaxa**, v. 38, n. May, p. 1–38, 2007.

GARCIA-PARRA, W.J. 2000. Citogenética comparativa de peixes da subfamília Myleinae (Serrasalminae, Characiformes) da Amazônia Central. Tese de Doutorado INPA/FUA. Manaus, AM. 155p.

GÉRY, J. Characoids of the world. **T.F.H. Publications**, Neptune City, New Jersey. 672p.

GOULDING, M. *The Fishes and the Forest: Explorations in Amazonian Natural History*. University of California Press, Berkeley, 280 pp, 1980.

GOULDING, M.; BARTHEM, R.; FERREIRA, E. The Smithsonian Atlas of the Amazon. Smithsonian Books, Washington e Londres, 2003.

HAFFER, J. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: An overview 8. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, n. 3, p. 451–476, 1997.

HARRIS, A.J., XIANG, Q.Y. Estimating ancestral distributions of lineages with uncertain sister groups: a statistical approach to dispersal vicariance analysis and a case using *Aesculus* L. (Sapindaceae) including fossils. **J. Syst. Evol.** 47, 349–368, 2009.

HASHIMOTO, D. T. et al. Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalminid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. **Aquaculture**, v. 321, n. 1-2, p. 49–53, nov. 2011.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–21, 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, 2004.

HELFMAN, G. S et al. The diversity of fishes Biology, Evolution, and Ecology. John Wiley & Sons, 720 p, 2009.

HOORN, C. et al. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. **Geology**, p. 237–240, 1995.

HOORN, C. et al. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6006, p. 927–31, 12 nov. 2010.

HRBEK, T., DA SILVA, V. M. et al. A New Species of River Dolphin from Brazil or : How Little Do We Know Our Biodiversity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11325, 2014.

- HUBER, O. Herbaceous ecosystems on the Guayana Shield, a regional overview. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 3, p. 464–475, 2006.
- HUBERT, N.; BONILLO, C. and PAUGY, D. Does elision account for molecular saturation: Case study based on mitochondrial ribosomal DNA among Characiform fishes (Teleostei, Ostariophysii). **Mol. Phylogenet. Evol.** 35: 300-308, 2005.
- HUBERT, N. et al. Evidence of reproductive isolation among closely related sympatric species of *Serrasalmus* (Ostariophysii, Characidae) from the Upper Madeira River, Amazon, Bolivia. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. SUPPL. A, p. 31–51, 2006.
- HUBERT, N.; RENNO, J. F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414–1436, ago. 2006.
- HUBERT, N. et al. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus* : implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2115–136. 2007a.
- HUBERT, N. et al. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. **Molecular ecology**, v. 16, n. 12, p. 2488–503, jun. 2007b.
- HUBERT, N. et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, 2008.
- IVANOVA, N. V. et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. January 2006, p. 544–548, 2007.
- JÉGU, M.; DOS SANTOS, G. M. Le genre *Serrasalmus* (Pisces, Serralsalmidae) dans le bas Tocantins (Brésil, Pará), avec la description d'une espèce nouvelle, *S. geryi*, du bassin Araguaia-Tocantins. **Revue d'hydrobiologie tropicale**, v. 21, n. 3, p. 239–274, 1988.
- JÉGU, M., LEÃO, E.L.M. & Dos SANTOS, G.M. *Serrasalmus compressus*, une espece nouvelle du Rio Madeira, Amazonie (Pisces: Serrasalmidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, 2, 97-108, 1991.
- JÉGU, M. Variations du niveaumarin et distribution des poissons d'eau douce en Amazonie Orientale. In: Prost, M.T. (Ed.), *Evolution des littoraux de Guyane et de la zone caraïbéméridionale pendant le quaternaire*. ORSTOM, Paris, pp. 281–297, 1992.
- JÉGU, M. et al. Description complémentaire et réhabilitation de *Tometes trilobatus* Valenciennes, 1850, espèce-type de *Tometes Valenciennes* (Characidae : Serrasalminae). **Cybium**, v. 26, n. 1, p. 99–122, 2002.
- JÉGU, M. Subfamily Serrasalminae. Pp. 182-184. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729 p, 2003.
- JÉGU, M. Taxinomie des Serrasalminae phytophages et phylogénie des Serrasalminae

(Teleostei: Characiformes: Characidae). Tese de Doutorado não publicada. Paris, Museum national d'histoire naturelle, 2004.

JÉGU, M.; HUBERT, N.; BELMONT-JÉGU, E. Réhabilitation de *Myloplus asterias* (Müller & Troschel, 1844), espèce-type de *Myloplus* GILL, 1896 et validation du genre *Myloplus* Gill (Characidae : Serrasalminae). **Cybium**, v. 28, n. 2, p. 119–157, 2004.

JÉGU, M.; KEITH, P. Le bas Oyapock limite septentrionale ou simple étape dans la progression de la faune des poissons d'Amazonie occidentale. **Académie des sciences/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS**, v. 322, p.1133–1143, 1999.

JÉGU, M.; KEITH, P. Une nouvelle espèce de Tometes (Teleostei: Characidae: Serrasalminae) du bouclier Guyanais, *Tometes lebaili* n. sp. **Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture**, p. 23–48, 2002.

JÉGU, M.; MENDES DOS SANTOS, G.; BELMONT-JÉGU, E. *Tometes makue* n.sp. (Characidae: Serrasalminae), une nouvelle espèce du bouclier Guyanais décrite des bassins du rio Negro (Brésil) et de L'Orénoque (Venezuela). **Cymbium**, v. 26, n. 1, p. 253–274, 2002.

JÉGU, M.; SANTOS, D. O. S. Révision du statut de *Myleus Setiger* Müller & Troschel, 1844 (Teleostei: Characidae: Serrasalminae) avec une description complémentaire des deux espèces. **Cybium**, v. 26, n. 1, p. 33–57, 2002.

JÉGU, M.; SANTOS, G. M. Mise Au Point À Propos de *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 et Réhabilitation De *S. Maculatus* Kner, 1858 (Characidae: Serrasalminae). **Cybium**, p. 119–143, 2001.

JÉGU, M.; TITO DE MORAIS, L.; SANTOS, G. M. Redescription des types d'*Utiaritchthys sennaebregai* Miranda Ribeiro, 1937 et description d'une nouvelle espèce du bassin Amazonien, *U. longidorsalis* (Characiformes, Serrasalmiade). **Cybium**, v. 16, n. 2, p. 105–120, 1992.

JOB, G. TREEFINDER version of March 2011. 2011. Munich, Germany. Distributed by the author at www.treefinder.de.

KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649, doi:[10.1093/bioinformatics/bts199](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199). 2012.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KRITSKY, D.C.; THATCHER, V.E & KAYTON, R.J. Neotropical Monogenoidea. 2. The Anacanthorinae PRICE, 1967, with the proposal of four new species of *Anacanthorus* MIZELLE & PRICE, 1965, from Amazon fishes. **Acta Amazônica** 9: 355-361, 1979.

LATRUBESSE, E. M. et al. Earth-Science Reviews The Late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. **Earth Science Reviews**, v. 99, n. 3-4, p. 99–124, 2010.

LEÃO, E.L.M.; LEITE, R.G.; CHAVES, P.T.C.; FERRAZ, E. Aspectos da reprodução, alimentação e parasitofauna de uma espécie rara de piranha, *Serrasalmus altuvei*, Raramirez, 1965 (Pisces, Serrasalminidae) do baixo rio Negro. **Ver. Bras. Biol.** 51(3): 545-553, 1991.

LEITE, R. N.; ROGERS, D. S. Revisiting Amazonian phylogeography: Insights into diversification hypotheses and novel perspectives. **Organisms Diversity and Evolution**, v. 13, n. 4, p. 639–664, 2013.

LEITE, Y. L. R.; KOK, P. J. R.; WEKSLER, M. Evolutionary affinities of the “ Lost World ” mouse suggest a late Pliocene connection between the Guiana and Brazilian shields. **Journal of Biogeography**, p. 1–10, 2015.

LÉVÊQUE, C. et al. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 545–567, 2008.

LIMA, F., RIBEIRO, A. Continental-scale tectonic controls of biogeography and Ecology in: **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**. University of California Press, 2011. p. 145–164.

LOVEJOY, N., ALBERT, J., CRAMPTON, W. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 21, p. 5–13, 2006.

LOVEJOY, N., DE ARAUJO, M. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 3, p. 259–268, 2000.

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

LUNDBERG J.G.; KOTTELAT, M.; SMITH, G.R.; STIASSNY, M.L.J.; GILL, A.C. So many fishes, so little time: An overview of recent ichthyological discovery in continental waters. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 87: 26–62, 2000.

LUNDBERG, J. G., M. H. SABAJ PÉREZ, W. M. DAHDUL, A. ORANGEL, and S. AGUILERA. The Amazonian Neogene fish fauna. In *Neogene History of Western Amazonia and Its Significance for Modern Biodiversity*, edited by C. Hoorn and F. P. Wesselingh. London: Blackwell, 2010.1.

MACHADO-ALLISON, A. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte II. Discusión sobre la condición monofilética de la subfamilia. **Acta Biol Venez**, v. 11, p. 145–195, 1983.

MACHADO-ALLISON, A. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae. Parte III: sobre el estatus genérico y relaciones filogenéticas de los géneros *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* y *Serrasalmus* (Teleostei-Characidae-Serrasalminae). **Acta Biologica Venezolana**, p. 19–42, 1985.

MACHADO-ALLISON, A.; FINK, W. L. Sinopsis de las especies de la subfamilia Serrasalminae, presentes en la cuenca del Orinoco. Serie peces de Venezuela, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Instituto de Zoología Tropical, Museo de Biología, 90p, 1995.

MACHADO-ALLISON, A.; FINK, W. L.; ANTONIO, M. E. Revisión del Género *Serrasalmus* LACEPEDE, 1803 y Géneros Relacionados en Venezuela: I. Notas sobre la morfología y sistemática de *Pristobrycon striolatus* (STEINDACHNER, 1908). **Acta Biologica Venezolana**, v. 12, n. 3-4, p. 140–171, 1989.

MACHADO-ALLISON, A. and FINK, W.L. Los Peces Caribes de Venezuela: Diagnosis, Claves, Aspectos Ecologicos y Evolutivos. Universidad Central de Venezuela, Caracas, 149 pp, 1996.

MACHADO, V. N. Análise da variabilidade genética da curimatã, *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, 66 pp, 2009.

MACIEL, H. M.; SOARES, M. G. M.; PRESTES, L. Reproduction of piranha *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858, on the floodplain lakes, Amazon, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 2, p. 97–102, 2011.

MARSHALL, E. Homely fish draws attention to Amazon deforestation. **Science** 267:814, 1995.

MATEUSSI, N. T. B. Revisão taxonômica das espécies cisandinas de *Mylossoma* Eigenmann & Kennedy, 1903 (Characiformes: Serrasalminidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 2015.

MATEUSSI, N.; PAVANELLI, C.; OLIVEIRA, C. M. Molecular identification of cryptic diversity in species of cis-Andean *Mylossoma* (Characiformes: Serrasalminidae). Mitochondrial DNA Part A, p. 1-3, 2016.

MELO, B. F. et al. Molecular phylogenetics of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 102, p. 189–201, 2016a.

MELO, B. F. et al. Cryptic species in the Neotropical fish genus *Curimatopsis* (Teleostei, Characiformes). **Zoologica Scripta**, n. November 2015, p. 1–9, 2016b.

MERCKX, A.; JÉGU, M.; SANTOS, G. M. Une nouvelle espèce de *Serrasalmus* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae), *S. altispinis* n. sp., décrite du rio Uatumã (Amazonas, Brésil) avec une description complémentaire de *S. rhombeus* (Linnaeus,

- 1766) du plateau Guyanais. **Cybium**, p. 181–201, 2000.
- MEYER, C. P. Phylogenetic relationships and evolutionary processes in East African cichlid fishes. **Trends Ecol. Evol.** 8:279-284, 1993.
- MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA Barcoding : Error Rates Based on Comprehensive Sampling. **PLoS BIOLOGY**, v. 3, n. 12, 2005.
- MONTES, C. et al. Middle Miocene closure of the Central American Seaway. **Science**, v. 348, n. 6231, p. 5–8, 2015.
- MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 7, p. 1855–1867, 2003.
- MÜLLER, J., TROSCHEL, F. H. *Horae Ichthyologicae. Beschreibung und Abbildung neuer Fische. Die Familie der Characinen. Erstes und Zweites Heft.* Berlin, 40p., 11 pls, 1845.
- MUNIS, M. D. B. Arco Purus : um gráben invertido revelado pela geofísica separando as Bacias do Solimões e do Amazonas, CPRM, Contribuições à geologia da Amazônia, v. 8, 2013.
- NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. A Comparative cytogenetic study of five piranhas species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. **Genética** 114: 231-236, 2002.
- NAKAYAMA, C. M.; FELDBERG, E.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalminae (Characiformes) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 53–58, 2012.
- NELSON, J. S. *Fishes of the world.* 4th. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006. v. 1
- NORES, M. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. **Journal of Biogeography**, p. 475–485, 1999.
- NORMAN, J. R. The South American characid fishes of the subfamily Serrasalmoninae, with a revision of the genus *Serrasalmus*, La Cepède. **Proceedings of the Zoological Society of London**, 1928(4): 781-829, pl. 1, 1929.
- NWANI, C. D. et al. DNA barcoding discriminates freshwater fishes from southeastern Nigeria and provides river system-level phylogeographic resolution within some species. **Mitochondrial DNA**, v. 22, n. S1, p. 43–51, 2011.
- NYLANDER, J.A.A., OLSSON, U., ALSTRÖM, P., SANMARTÍN, I. Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: a Bayesian approach to dispersal– vicariance analysis of the thrushes (Aves: Turdus). **Syst. Biol.** 57, 257–268, 2008.
- OLIVEIRA, C. et al. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae

(Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 275, 2011.

OLIVEIRA, R.R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M.B.d.; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotrop. Ichthyol.**, 5: 301-306, 2007.

ORTÍ, G. et al. Patterns of Nucleotide Change in Mitochondrial Ribosomal RNA Genes and the Phylogeny of Piranhas. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, p. 169–182, 1996.

ORTI, G. and MEYER, A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Syst. Biol.** 46: 75-100, 1997.

ORTÍ, G. et al. Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 1, p. 343–351, 2008.

OTA, R. P. **Revisão taxonômica e Filogenia morfológica de *Metynnis* Cope, 1878 (Characiformes: Serrasalminae)**. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, 2015.

PADIAL, J. M. et al. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, p. 16, 2010.

PAGEZY, H.; JÉGU, M. Valeur Patrimoniaire De Serrasalminae Herbivores Du Haut Maroni (Guyane Française): Approches Biologique Et Socioculturelle En Pays Wayana. **Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture**, n. 364, p. 49–69, 2002.

PATTON, J. L.; DA SILVA, M. N. F.; MALCOLM, J. R. Gene Genealogy and Differentiation Among Arboreal Spiny rats (Rodentia : Echimyidae) of the Amazon Basin : A Test of the Riverine Barrier Hypothesis. **Evolution**, v. 48, n. 4, p. 1314–1323, 1994.

PEARSE, D., ARNDT, A. et al. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: Continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). **Molecular Ecology**, v. 15, n. 4, p. 985-1006, 2006.

PEREIRA, L. H. et al. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, v. 14, n. 1, p. 20, 2013.

PEREIRA, T. N. A.; CASTRO, R. M. C. A new species of *Utiaritichthys* Miranda Ribeiro (Characiformes: Serrasalminae) from the Serra dos Parecis, Tapajós drainage. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 2, p. 397–402, 2014.

PIORSKI, N., GARAVELLO, J. et al. *Platydoras brachylecis*, a new species of thorny catfish (Siluriformes: Doradidae) from northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 3, p. 481–494, 2008.

PORTO, J.I.R. Análise cariotípica e sequenciamento do mtDNA de populações de *Mylesinusparaschomburgkii* (Characiformes, Serrasalminidae) da bacia Amazônica. Tese de Doutorado não publicada. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade do Amazonas. 1999, 120pp.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **Avida dos Vertebrados**. 4 ed. Atheneu. 2008.

RACH, J. et al. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. November 2007, p. 237–247, 2008.

RANNALA, B., and Z. YANG. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **J. Mol. Evol.** 43:304-311, 1996

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. April 2016, p. 355–364, 2007.

REIS, R. E. et al. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. 1. ed. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

REIS, R. E. et al. Fish Biodiversity and Conservation in South America. **Journal of fish biology**, n. June, 2016.

RENNO, J. F., HUBERT, N. et al. Phylogeography of Cichla (Cichlidae) in the upper Madera basin (Bolivian Amazon). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 41, p. 503–510, 2006.

RENNO, J. F., MACHORDOM, A. et al. Poly morphism of mitochondrial genes in populations of *Leporinus friderici* (Bloch, 1974): intraspecific structure and zoogeography of the Neotropical fish. **Genetica**, v. 84, p. 137–142, 1991.

RIBAS, C. C. et al. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1729, p. 681–689, 2012.

RIBEIRO, L. B.; MATOSO, D. A.; FELDBERG, E. Chromosome mapping of repetitive sequences in four Serrasalminidae species (Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 46–53, 2014.

RONQUIST, F. Dispersal-Vicariance Analysis: A New Approach to the Quantification of Historical Biogeography. **Syst Biol**, v. 46, p. 195-203, 1997.

RONQUIST, F., HUELSENBECK, J., TESLENKO, M. MrBayes Version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries. **Bioinformatics**, 2011.

ROSSETTI, D. F., VALERIANO, M. Evolution of the lowest amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. **Catena**, v. 70, n. 2, p.

253-265, 2007.

ROSSETTI, D. F. et al. Mid-Late Pleistocene OLS chronology in western Amazonian and implications for the transcontinental Amazon pathway. **Sedimentary Geology**, 2015.

SACEK, V. Drainage reversal of the Amazon River due to the coupling of surface and lithospheric processes. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 401, p. 301–312, 2014.

SALZBURGER, W., EWING, G., VON HAESLER, A. *The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration*. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 9, p. 1952–1963, 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. A Neighbour-Joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 1987.

SANTANA, M. P. et al. Diversidade cariotípica de piranha vermelha (*Pygocentrus nattereri*) (Characiformes, Characidae), rio Salobo, bacia do Araguaia, Pará, Brasil. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 2, p. 58–65, 2011.

SANTOS, G. M.; PINTO, SULAMITA, S.; JÉGU, M. Alimentação do pacu-cana, *Mylesinus paraschomburgkii* (Teleostei, Serrasalminae) em rios da Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 57, n. 2, p. 311–315, 1997.

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, 2007.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, v. 16, p. 393-430, 1985.

SOARES, M. G. M. et al. Peixes de lagos do médio Rio Solimões. 2 ed. ver. Manaus-Instituto I - PIATAM, 2008.

SOLOMON, S.E., BACCI JR, M. et al. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS One** 3, e2738, 2008.

TEIXEIRA, A.S.; NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. 2006. Esterase-D and chromosome patterns in Central Amazon piranha (*Serrasalmus rhombeus*, Linnaeus, 1766) from lake Catalão. **Genet. Mol. Biol.** 29(3): 498-502.

TISSEUIL, C., CORNU, J. et al. Global diversity patterns and cross-taxa convergence in freshwater systems. **Journal of Animal Ecology**, v. 82: 365-376, 2013.

THATCHER, V.E. 1991. Amazon fish parasites. **Amazoniana** 11(3/4): 263-572.

THOMPSON, A. W. et al. A time-calibrated, multi-locus phylogeny of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalminae) and a comparison of species tree methods.

Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 81, n. March, p. 242–257, 2014.

TORRENTE-VILARA, G., ZUANON, J. et al. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). **Ecology of Freshwater Fish**, v. 20, n. 4, p. 588–597, 2011.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 5, p. 1193–1213, 2013.

TURNER, T. F. et al. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. **Journal of Fish Biology**, p. 186–201, 2004.

VALENCIENNES, A. Des genres Tomète, Mylée et Mylésine. Pp. 225-237, 1850. In: Cuvier G. & A. Valenciennes. Histoire naturelle des Poissons. Tome vingt-deuxième, Suite du livre vingt- deuxième, Suite de la famille des Salmonoides, Paris et Starsbourg, Bertrand et Levrault.

VAN EVERY, L. R.; KRITSKY, D. C. Neotropical Monogenoidea .18. *Anacanthorus Mizelle and Price, 1965 (Dactylogyridae, Anacanthorinae) of Piranha (Characoidea, Serrasalmidae) From the Central Amazon, Their Phylogeny, and Aspects of Host-Parasite Coevolution.* **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v. 59, n. 1, p. 52–75, 1992.

WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847–1857, 2005.

WEIR, B., COCKERHAM, C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. **Evolution**, v. 38 n. 6, p. 1358–1370, 1984.

WESSELINGH, F. P.; HOORN, C. Geological Development of Amazon and Orinoco Basins. In: **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. University of California Press, 2011. p. 59–68.

WILCOX, T., ZWICKL, D. et al. Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, n. 2, p. 361–371, 2002.

WILLIS, S., NUNES, M., MONTAÑA, C. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 1, p. 291–307, 2007.

WILLIS, S., NUNES, M., et al. The Casiquiare river acts as a corridor between the Amazonas and Orinoco river basins: biogeographic analysis of the genus *Cichla*. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 5, p. 1014–1030, 2010.

WINEMILLER, K. O. et al. Fish assemblages of the Casiquiare River, a corridor and zoogeographical filter for dispersal between the Orinoco and Amazon basins. **Journal**

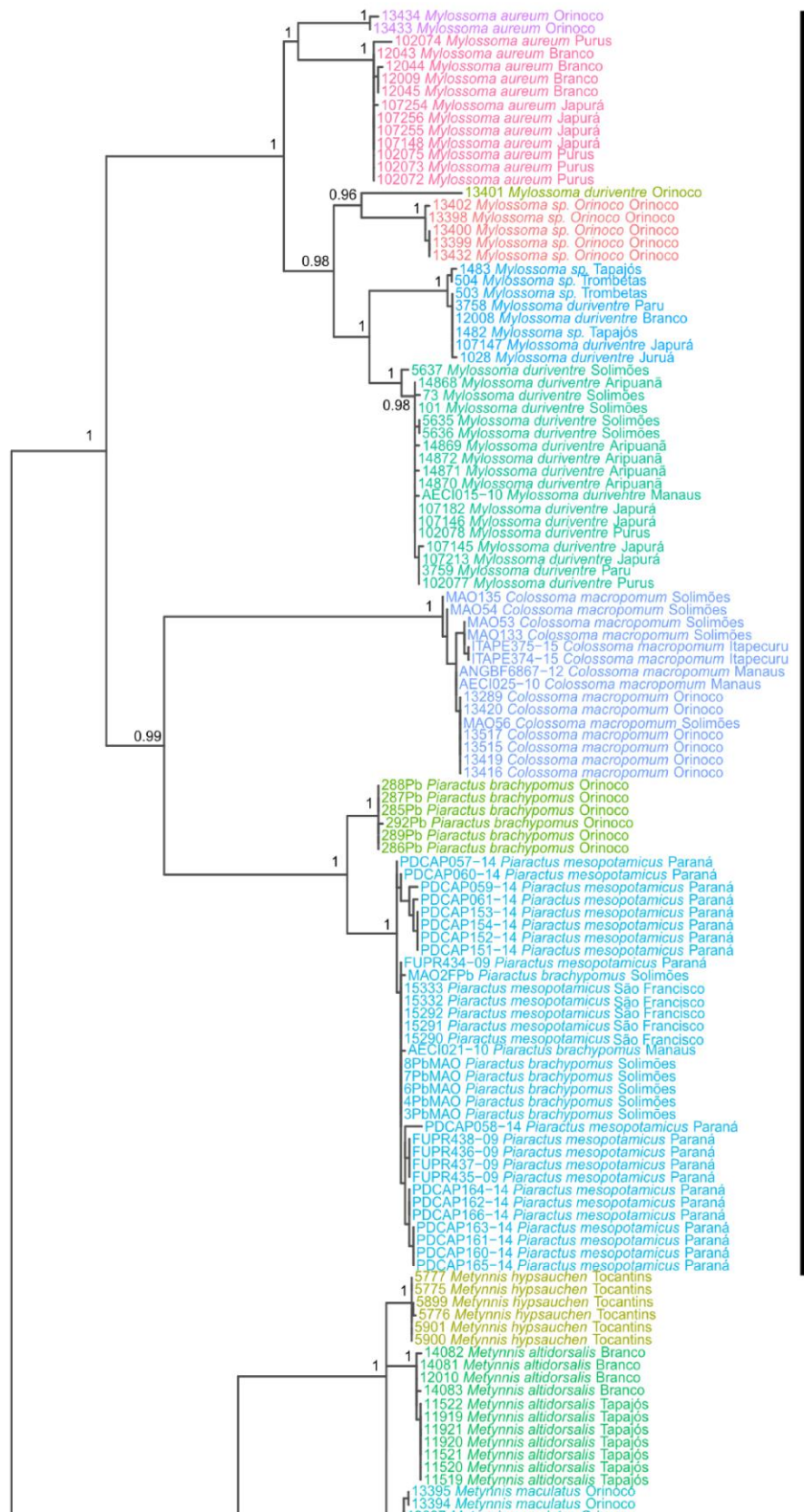
of Biogeography, v. 35, n. 9, p. 1551–1563, 2008.

WRIGHT, S. *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 2. The Theory of Gene Frequencies*. Chicago: Univ. Chicago Press. 1969.

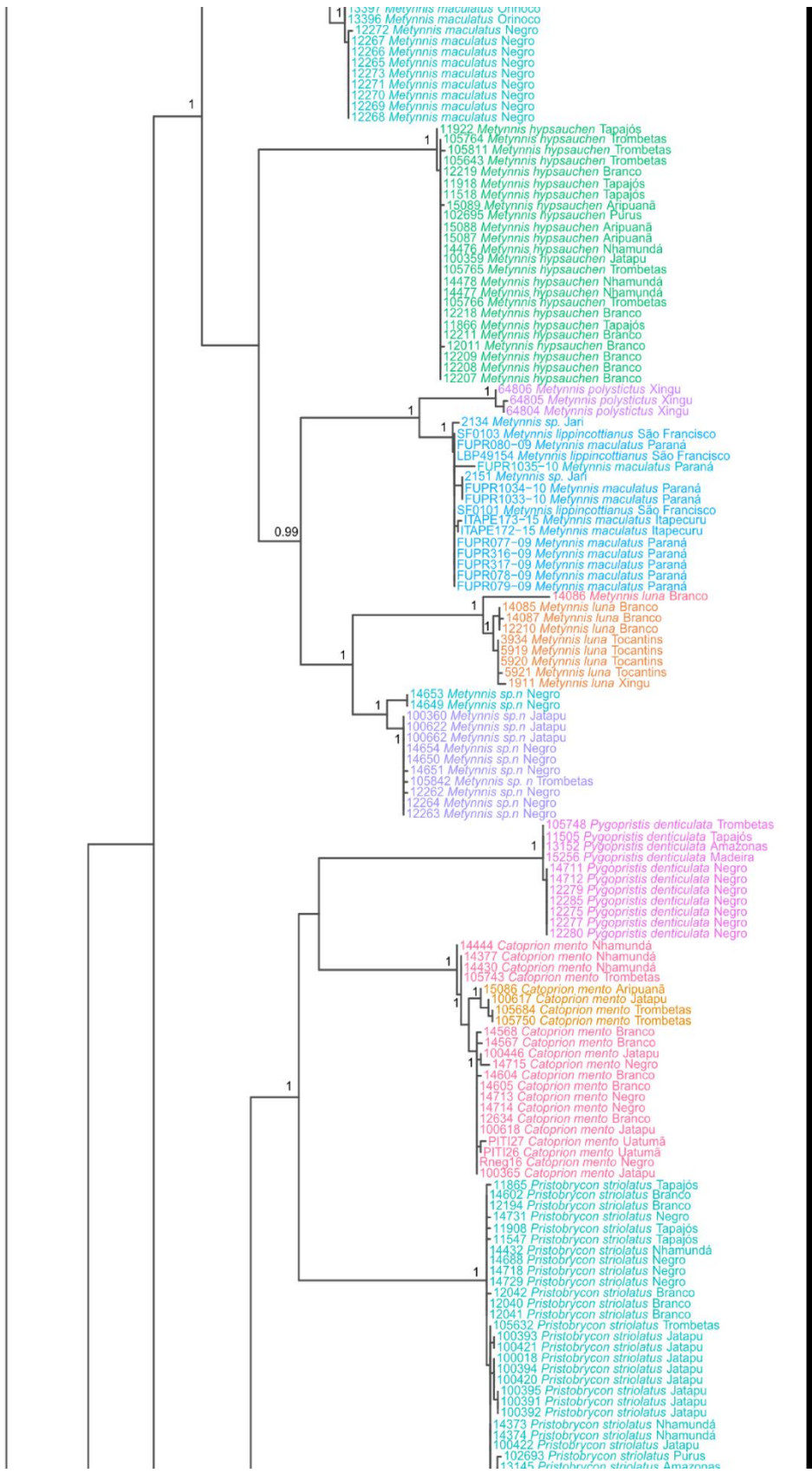
YU, Y., HARRIS, A. et al. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 87, p. 46-49, 2015.

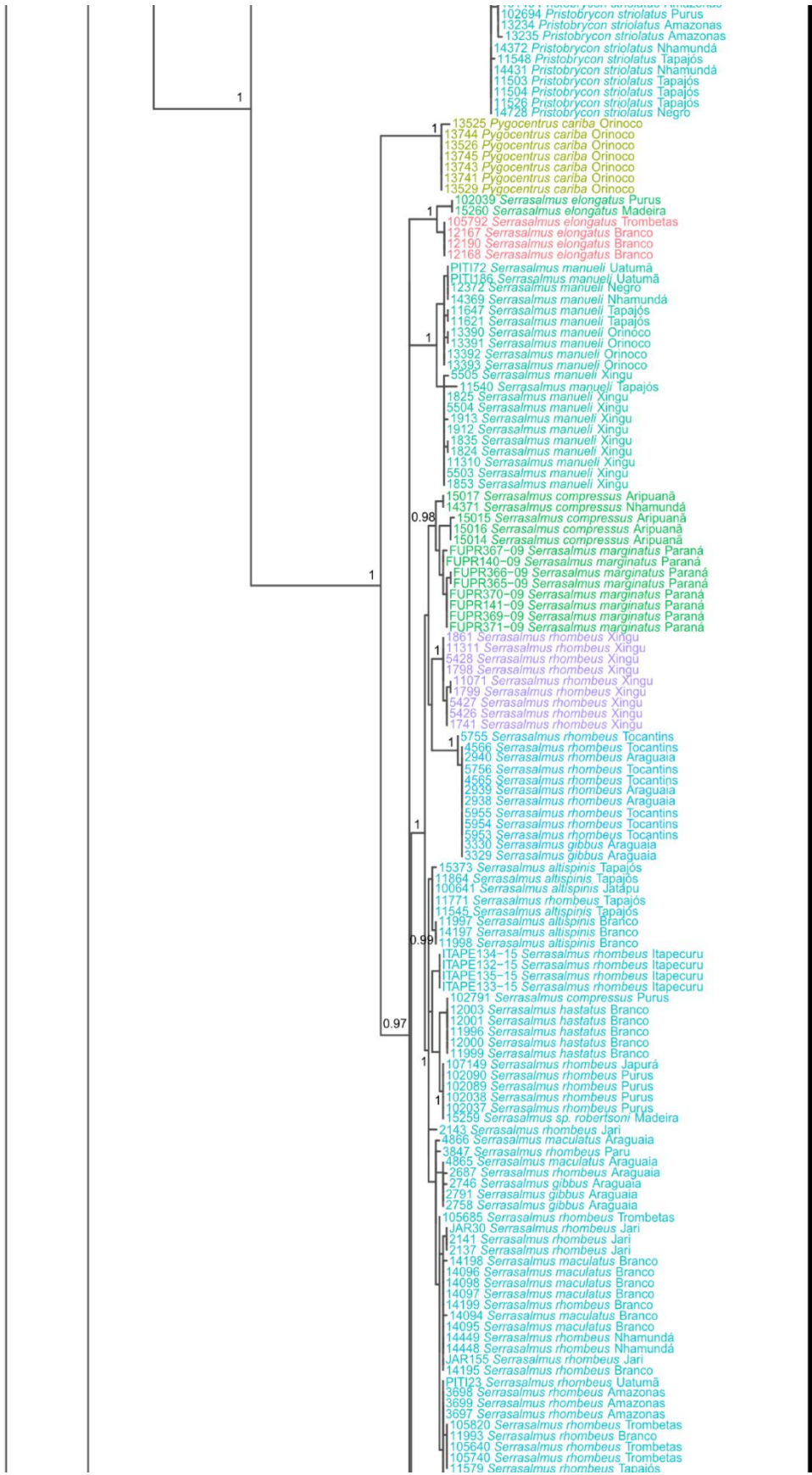
ZUANON, J.A.S. 1999. *História natural da ictiofauna de corredeiras do rio Xingu, na região de Altamira, Pará*. Ph.D. Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil, 190pp.

ANEXOS



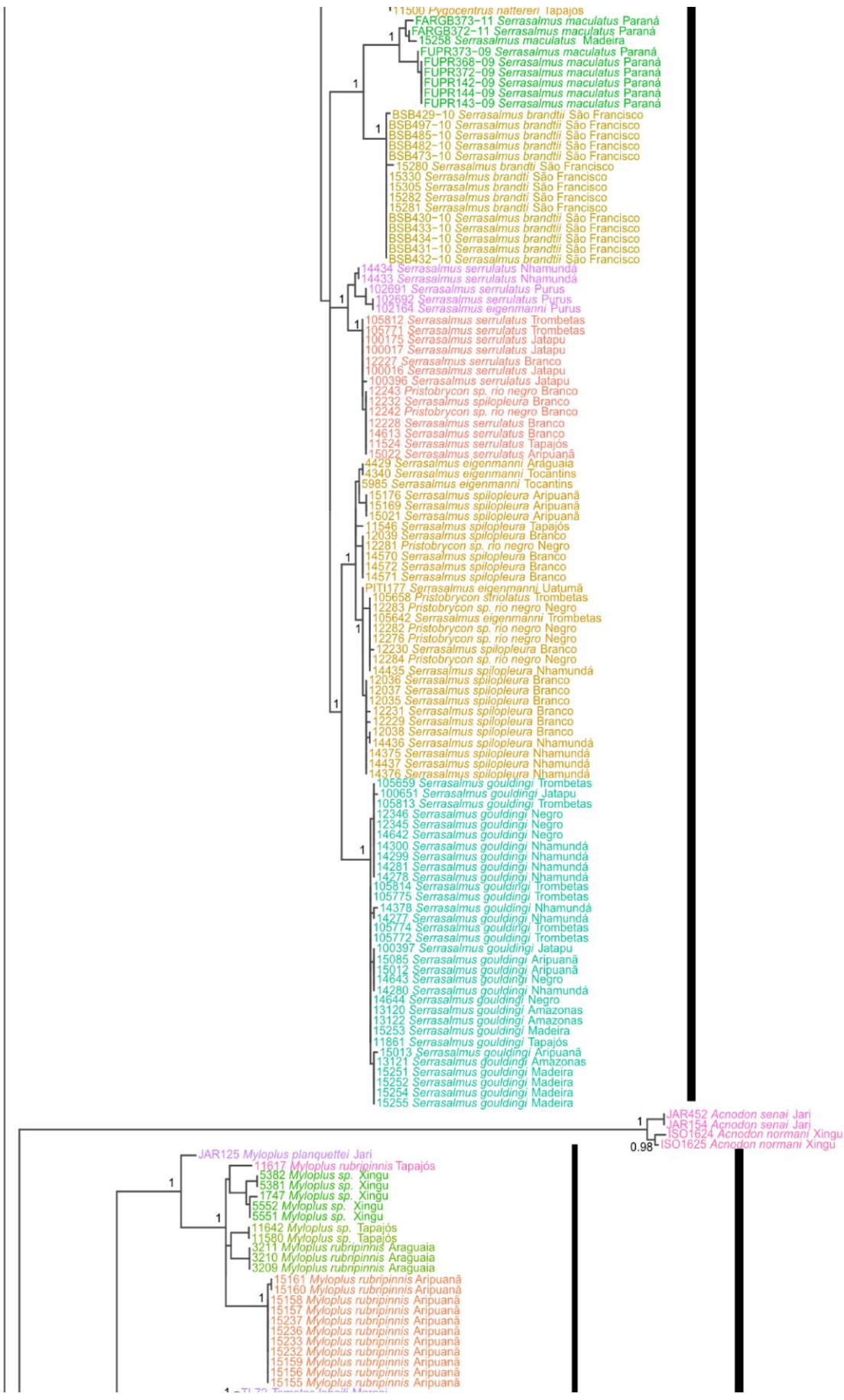
Grupo A

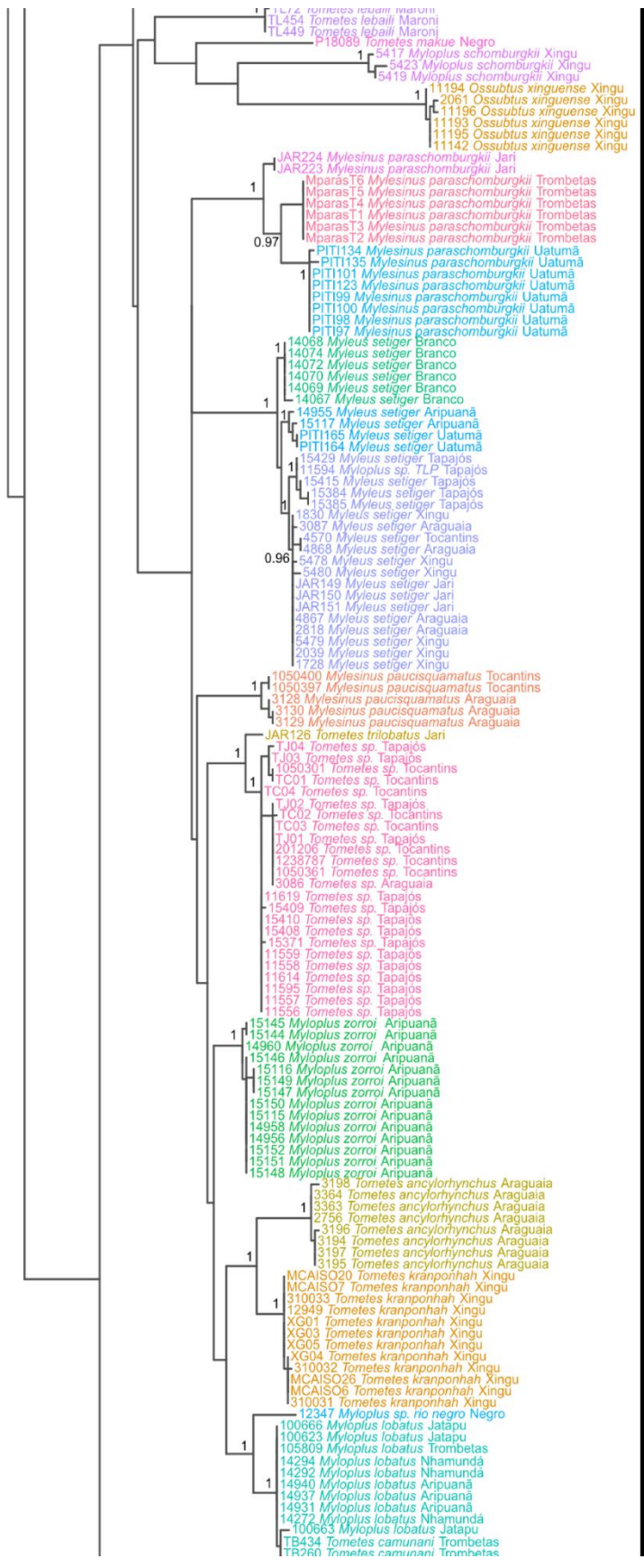




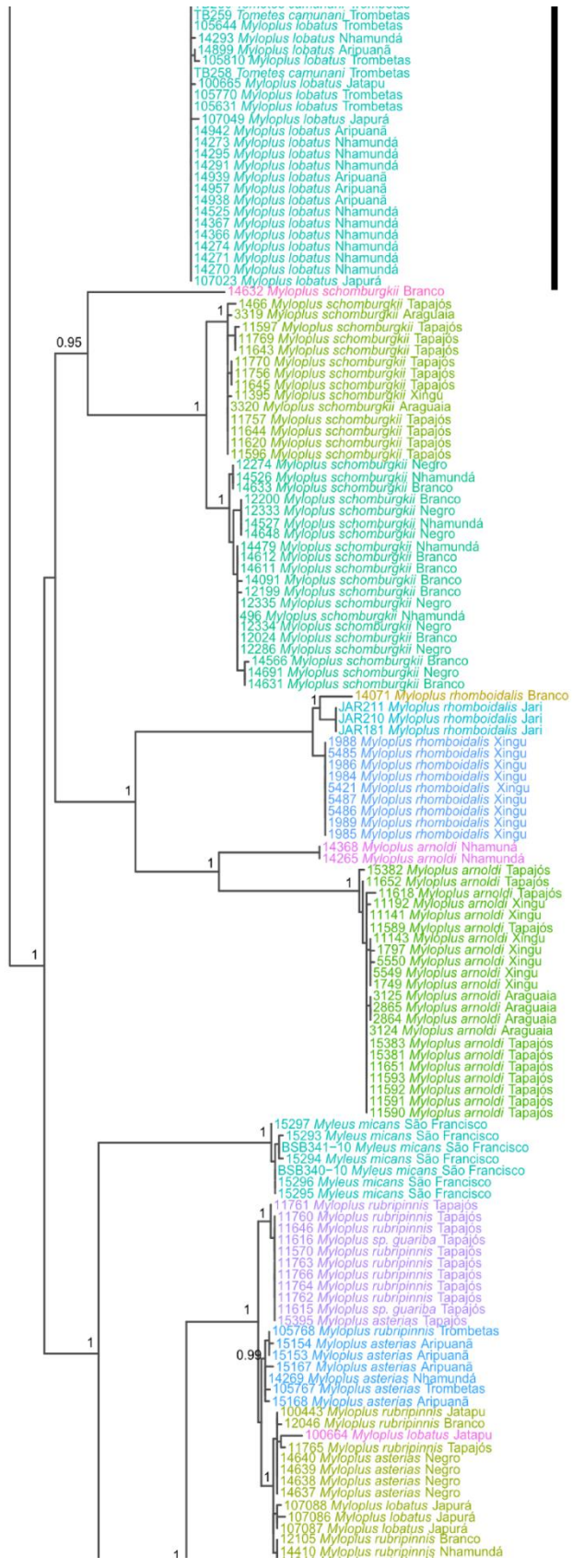
Grupo B

13295 *Serrasalmus rhombeus* Orinoco
 13296 *Serrasalmus rhombeus* Orinoco
 13294 *Serrasalmus rhombeus* Orinoco
 3848 *Serrasalmus rhombeus* Paru
 11992 *Serrasalmus rhombeus* Branco
 PTT140 *Serrasalmus rhombeus* Uatuma
 PTT129 *Serrasalmus rhombeus* Uatuma
 105741 *Serrasalmus rhombeus* Trombetas
 105793 *Serrasalmus rhombeus* Trombetas
 PTT141 *Serrasalmus rhombeus* Uatuma
 PTT124 *Serrasalmus rhombeus* Uatuma
 PTT122 *Serrasalmus rhombeus* Uatuma
 PTT121 *Serrasalmus rhombeus* Uatuma
 PTT139 *Serrasalmus rhombeus* Uatuma
 13256 *Serrasalmus rhombeus* Orinoco
 11991 *Serrasalmus rhombeus* Branco
 PTT137 *Serrasalmus rhombeus* Uatuma
 11989 *Serrasalmus rhombeus* Branco
 11990 *Serrasalmus rhombeus* Branco
 14447 *Serrasalmus rhombeus* Nhamunda
 14200 *Serrasalmus rhombeus* Branco
 14446 *Serrasalmus rhombeus* Nhamunda
 13256 *Serrasalmus rhombeus* Orinoco
 11578 *Serrasalmus rhombeus* Tapajós
 11759 *Serrasalmus rhombeus* Tapajós
 11541 *Serrasalmus rhombeus* Tapajós
 15019 *Serrasalmus rhombeus* Aripuanã
 14445 *Serrasalmus rhombeus* Nhamunda
 14370 *Serrasalmus rhombeus* Nhamunda
 14093 *Serrasalmus rhombeus* Branco
 107204 *Serrasalmus rhombeus* Japurá
 107166 *Serrasalmus rhombeus* Japurá
 107150 *Serrasalmus rhombeus* Japurá
 107124 *Serrasalmus rhombeus* Japurá
 107123 *Serrasalmus rhombeus* Japurá
 107048 *Serrasalmus rhombeus* Japurá
 107047 *Serrasalmus rhombeus* Japurá
 PTT183 *Serrasalmus rhombeus* Uatuma
 15228 *Serrasalmus rhombeus* Aripuanã
 15020 *Serrasalmus rhombeus* Aripuanã
 15018 *Serrasalmus rhombeus* Aripuanã
 13260 *Serrasalmus rhombeus* Orinoco
 13259 *Serrasalmus rhombeus* Orinoco
 14196 *Serrasalmus rhombeus* Branco
 11863 *Serrasalmus rhombeus* Tapajós
 11862 *Serrasalmus rhombeus* Tapajós
 11758 *Serrasalmus rhombeus* Tapajós
 107262 *Serrasalmus rhombeus* Japurá
 11544 *Serrasalmus rhombeus* Tapajós
 11543 *Serrasalmus rhombeus* Tapajós
 11542 *Serrasalmus rhombeus* Tapajós
 14873 *Serrasalmus rhombeus* Aripuanã
 11772 *Serrasalmus rhombeus* Tapajós
 BSB453-10 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 15289 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 15287 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 BSB472-10 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 BSB490-10 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 BSB481-10 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 BSB486-10 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 BSB487-10 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 BSB471-10 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 BSB406-10 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 15288 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 15286 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 15285 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 15284 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 15283 *Pygocentrus piraya* São Francisco
 3696 *Pygocentrus nattereri* Amazonas
 3695 *Pygocentrus nattereri* Amazonas
 15277 *Pygocentrus nattereri* Guaporé
 15278 *Pygocentrus nattereri* Guaporé
 15276 *Pygocentrus nattereri* Guaporé
 15274 *Pygocentrus nattereri* Guaporé
 15273 *Pygocentrus nattereri* Guaporé
 15272 *Pygocentrus nattereri* Guaporé
 15435 *Pygocentrus nattereri* São Bento
 15434 *Pygocentrus nattereri* São Bento
 15431 *Pygocentrus nattereri* São Bento
 15435 *Pygocentrus nattereri* São Bento
 15432 *Pygocentrus nattereri* São Bento
 3905 *Pygocentrus nattereri* Tocantins
 3904 *Pygocentrus nattereri* Tocantins
 3903 *Pygocentrus nattereri* Tocantins
 4557 *Pygocentrus nattereri* Tocantins
 2932 *Pygocentrus nattereri* Araguaia
 2931 *Pygocentrus nattereri* Araguaia
 4558 *Pygocentrus nattereri* Tocantins
 ITAPE143-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE147-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE136-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 4556 *Pygocentrus nattereri* Tocantins
 2933 *Pygocentrus nattereri* Araguaia
 15430 *Pygocentrus nattereri* São Bento
 5682 *Pygocentrus nattereri* Javan
 ITAPE139-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE142-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE140-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE144-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE141-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE138-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE149-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE146-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE145-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE150-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE148-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 ITAPE137-15 *Pygocentrus nattereri* Itapecuru
 3581 *Pygocentrus nattereri* Amazonas
 644 *Pygocentrus nattereri* Amazonas
 3580 *Pygocentrus nattereri* Amazonas
 3830 *Pygocentrus nattereri* Paru
 3829 *Pygocentrus nattereri* Paru
 3579 *Pygocentrus nattereri* Amazonas
 643 *Pygocentrus nattereri* Amazonas
 3831 *Pygocentrus nattereri* Paru
 102084 *Pygocentrus nattereri* Purus
 105817 *Pygocentrus nattereri* Trombetas
 105742 *Pygocentrus nattereri* Branco
 141408 *Pygocentrus nattereri* Branco
 141407 *Pygocentrus nattereri* Branco
 45553 *Pygocentrus nattereri* Xingu
 11499 *Pygocentrus nattereri* Tapajós
 11498 *Pygocentrus nattereri* Tapajós
 12603 *Pygocentrus nattereri* Branco
 14105 *Pygocentrus nattereri* Branco
 11497 *Pygocentrus nattereri* Tapajós
 102085 *Pygocentrus nattereri* Purus
 102036 *Pygocentrus nattereri* Purus
 15263 *Pygocentrus nattereri* Madeira
 15262 *Pygocentrus nattereri* Madeira
 15261 *Pygocentrus nattereri* Madeira
 14106 *Pygocentrus nattereri* Branco
 12626 *Pygocentrus nattereri* Branco
 11501 *Pygocentrus nattereri* Tapajós





C1



Grupo C

C2

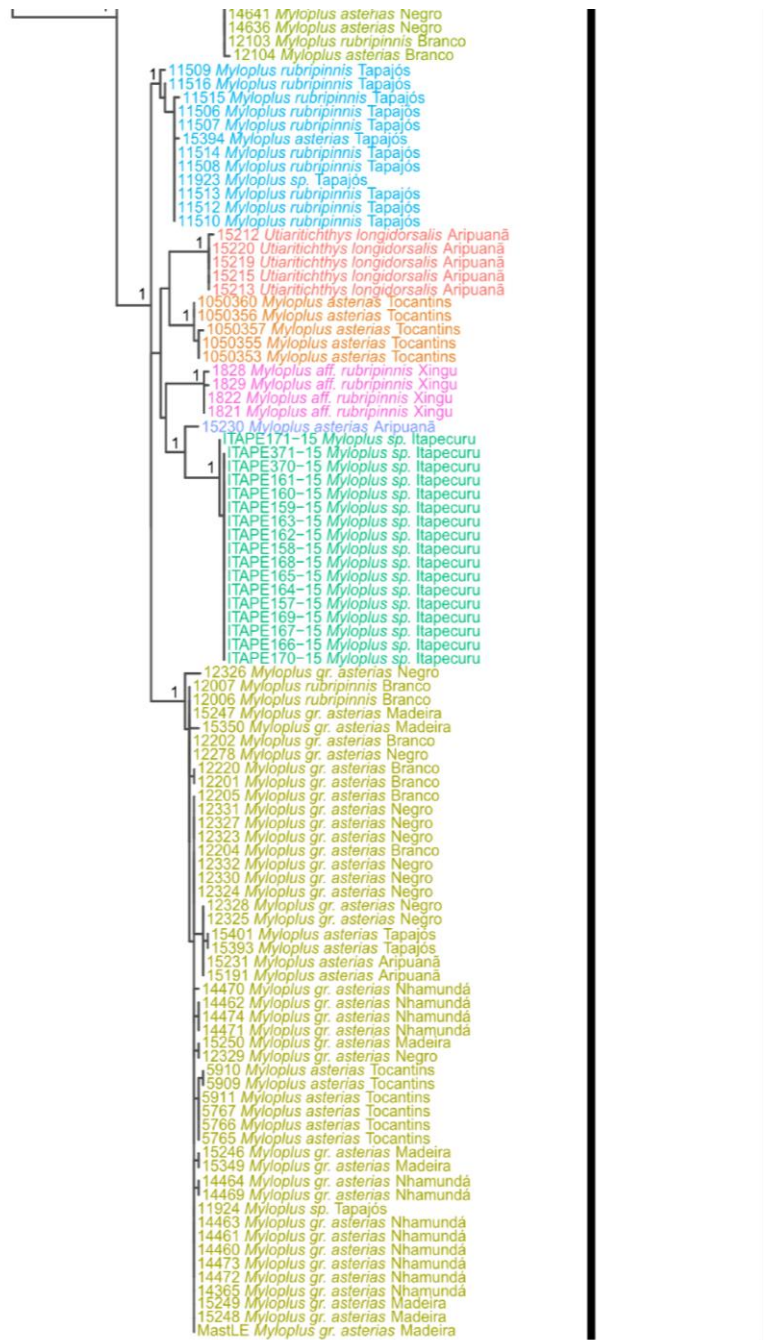


Figura 02. Árvore de Neighbor-joining das 1.036 sequências do gene Citocromo c oxidase subunidade I de 68 espécies e morfotipos de Serrasalminae usando o modelo Kimura 2-parâmetros. Cores diferentes significa linhagens distintas. Grupo A = grupo Pacu; grupo B = grupo das Piranhas e grupo C = grupo Myleus