



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE MESTRADO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO
DA BIODIVERSIDADE

**FILOGEOGRAFIA DE *Jupiaba acanthogaster* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE) DAS BACIAS DOS RIOS PARAGUAI, XINGU E TAPAJÓS**

RODRIGO CORREA MIGUEIS JACOB

CUIABÁ – MT

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE MESTRADO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO
DA BIODIVERSIDADE

**FILOGEOGRAFIA DE *Jupiaba acanthogaster* (CHARACIFORMES,
CHARACIDAE) DAS BACIAS DOS RIOS PARAGUAI, XINGU E TAPAJÓS**

RODRIGO CORREA MIGUEIS JACOB

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação, do Instituto de
Biociências, para obtenção do título de
Mestre em Ecologia e Conservação da
Biodiversidade.**

CUIABÁ – MT

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

J15f

Jacob, Rodrigo Correa Migueis.

Filogeografia de *Jupiaba acanthogaster* (Characiformes, Characidae) das Bacias dos Rios Paraguai, Xingu e Tapajós./
Rodrigo Correa Migueis Jacob. Cuiabá: UFMT, 2012.

42 fls

Dissertação - Mestrado em Ecologia e Conservação
da Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Cunha Ribeiro

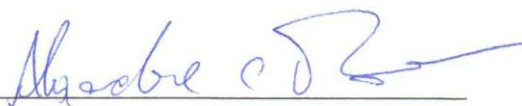
Co-orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

1.Filogeografia. 2. *Jupiaba acanthogaster*. 3.Bacia do
Alto Paraguai. 4.Geologia. I.Título.

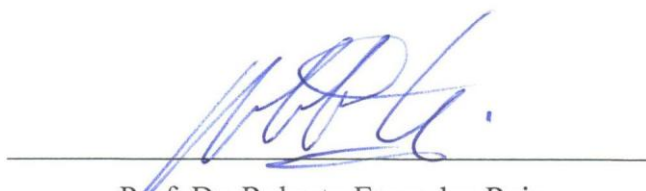
CDU 573:574

ORIENTADOR: ALEXANDRE CUNHA RIBEIRO

CO-ORIENTADOR: CLAUDIO DE OLIVEIRA

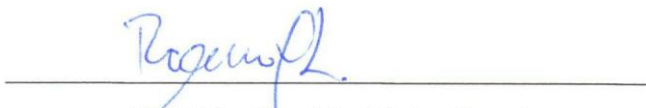
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Cunha Ribeiro
Universidade Federal de Mato Grosso
Orientadora



Prof. Dr. Roberto Esser dos Reis
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Examinador Externo

Prof. Dr. Paulo Cesar Venere
Universidade Federal de Mato Grosso
Examinador Titular



Prof. Dr. Rogério Vieira Rossi
Universidade Federal de Mato Grosso
Examinador Suplente

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Sérgio Jacob, que tanto amo e agradeço; A “tia” Val, Valdenice; A minha mãe, Eliane; As minhas irmãs, Paloma, Paola, Jane, Anna Carolinne e meu irmão João Gabriel. Aos meus avós, Ibson, Lucila e Jane. Aos meus amigos. Ao meu amor. OBRIGADO, por me ajudar a terminar mais um etapa da minha vida.

EPÍGRAFE

Não importa aonde você parou...

Em que momento da vida você cansou...

O que importa é que sempre é possível e necessário "Recomeçar".

Recomeçar é dar uma chance a si mesmo...

É renovar as esperanças na vida e o mais importante...

Acreditar em você de novo.

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por todos os momentos da minha vida, pois sempre iluminou o meu caminho, com as minhas decisões.

A Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) pela oportunidade ao ensino, com os melhores professores de graduação, mestrado e aos professores-amigos que tive durante o curso como Prof. Marcos A, Prof^a. Soraia, Prof^a. Edna, Prof. Edson, Prof. Vavá, Prof. Marcos S. Prof^a. Adelina, Prof^a.Cláudia e Prof^a.Katiane.

Aos grandes amigos da graduação, como minha “irmã” Vera Uhde e a Ana Bárbara. E do mestrado, que me fizeram uma pessoa melhor como a Paty, a Eliana, a Katy que me ajudou a todos os momentos, a Andrea, Janinha e a Nilce.

Ao meu amigo Luiz Perreira, que me ensinou muito sobre Biologia Molecular, assim como as técnicas, obrigado mesmo.

Ao pessoal de Botucatu, que tenho muito carinho, Leticia Gushi, Betina, Gi e ao Mahmoud.

Ao meu orientador Prof. Alexandre Cunha Ribeiro, e ao meu co-orientador Prof. Claudio de Oliveira.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Alexandre, Prof. Roberto, Prof. Paulo e Prof. Rogerio, pelas sugestões apresentada para a melhoria do meu trabalho.

A CAPES por me oferecer a bolsa de estudos, que me possibilitou a realizar minha pesquisa.

Ao Reginaldo e sua Família, obrigado pela força e pela paciência e me incentivar.

A minha família, que amo eternamente, agradeço por sempre estar por perto.

Ao meu pai, tenho que agradecer-lhe a vida, e elogiar a maneira como criou minhas irmãs e a mim, um homem batalhador e muito inteligente.

À tia Val, uma pessoa admirável e carinhosa, agradeço o seu amor por mim e pelas minhas irmãs.

À minha mãe, obrigado por me fazer sorrir quando estou triste, e me escutar quando estou chorando. Sempre estarei ao seu lado.

Ao tio Luís, que me ajudou muito nas minhas idas à Botucatu.

Aos meus irmãos, um grande time. As meninas, Paloma, Paola, Jane e Carol e o grande Gabriel.

Aos meus avós, que tanto amo; minha avó Jane e Lucila, e meu avô Ibson, pelo carinho, amor e torcida.

Aos meus tios, e aos meus primos. Gosto muito vocês.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram para a realização deste curso, e em meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional. Deus os abençoe!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Espécimes coletadas	19
3.2. Extração de DNA, PCR e Sequenciamento.	22
3.3. Análise de dados	23
3.3.1. Análise de sequência de DNA	23
3.3.2. Análise Populacional	23
3.3.3 Análises Filogeográficas	23
4. RESULTADO	25
4.1. Análise Populacional	27
4.2. Análises Filogeográficas	31
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar de *Jupiaba acanthogaster* (Depositado na coleção de peixes da UFMT). 19
- Figura 2.** Região do Planalto Central Brasileiro e as localizações dos espécimes utilizadas no presente trabalho. Os números indicam os pontos de amostragem (1- Rio Culuene, 2- Córrego São Francisco, 3- Rio Cuiabá, 4- Rio Córrego-açú, 5- Rio Salobra, 6- Rio Taquari, 7- Ribeirão dos veados, 8- Rio Paciência, 9- Rio Angelim, 10- Rio Aricá-mirim, 11- Córrego Pinguela, 12- Rio Paraguai (Corumbá), 13- Rio Paraguai (S.Araras), 14- Rio dos Patos, 15- Rio Piquiri), e as letras os principais rios das bacias (A- Rio Xingu, B- Rio Arinos, C- Rio Paraguai) (as coordenadas geográficas estão listadas na Tabela 1). 20
- Figura 3.** (Página anterior) Dendrograma de Neighbor-joining obtido a partir das sequências parciais do gene COI evidenciando a presença de três grupos (A(B+C)). Os valores acima dos nós representam o suporte estatístico de NJ bootstrap (1000 pseudo-réplicas). Os números dos peixes representam os números dos seus respectivos vouchers, e na frente à drenagem da coleta. 26
- Figura 4.** Rede de Haplótipos com agrupamentos de localidades de coleta formando três áreas geográficas (GRUPO A;B;C), os riscos com números indicam os passos mutacionais de uma haplótipo ao outro, os círculos indicam os haplótipos e a cor, a localidade que ele está presente. GRUPO A= AZUL (1: Rosa Escuro) ; GRUPO B = VERDE (14: Cinza Escuro e 15: Cinza Claro) e GRUPO C= VERMELHO (2: Azul Claro; 3: Azul Médio; 4: Preto; 5: Laranja.; 6: Roxo Claro; 7: Azul Escuro; 8: Branco; 9: Verde Escuro; 10: Rosa Claro; 11: Roxo Escuro; 12: Verde Claro; 13: Amarelo). Os números indicam as localidades (Veja a Tabela 1). 31
- Figura 5.** (Página anterior) Árvore filogenética de *Jupiaba acanthogaster* obtido a partir da análise de Máxima Parcimônia. Os valores acima dos nós representam o suporte estatístico de MP bootstrap (1000 pseudo-réplicas). Os números dos peixes representam os números dos seus respectivos vouchers, e na frente à drenagem da coleta. 32
- Figura 6.** Cladograma de área com base na análise de Máxima Parcimônia e distribuição da espécie de *Jupiaba acanthogaster*. Os retângulos indicam os Grupos. 33
- Figura 7.** Distribuição de *Jupiaba acanthogaster* (pontos vermelhos). A área circundada de vermelho é a região do Pantanal. 37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação de localidades dos exemplares utilizados nas análises filogenéticas e seus respectivos dados sobre localidade de coleta, e os números dos tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP, Campus Botucatu. 21
- Tabela 2.** Distância genética K2P obtida entre as 15 localidades amostradas (Os números indicam as localidades (Tabela 1)). Em negrito, o valor médio da distância genética observada dentro de cada localidade. Linha 16 = comparação com grupo externo. 25
- Tabela 3.** Distâncias genéticas K2P obtidas entre os três grupos formados (Grupo A é formado pela população1; o Grupo B pelas localidades 14 e 15; o Grupo C pelas localidades 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 e 13 e o OUT representa o grupo externo (*J. polylepis*)). Em negrito está o valor médio da distância genética K2P obtida dentro de cada grupo. 27
- Tabela 4.** Diversidade genética observada nas diferentes localidades de *J. acanthogaster* (Tabela1). N= tamanho de amostra; H= número de haplótipos; Hd= diversidade haplotípica; Pi (π)= diversidade nucleotídica. 27
- Tabela 5.** Distribuição das amostras de acordo com as localidades (Tabela 1) e haplótipos de *Jupiaba acanthogaster*. (-) haplótipos não encontrados. 28
- Tabela 6.** Análise da variância molecular (AMOVA), F_{ST} , F_{CT} e F_{SC} entre as localidades de *J. acanthogaster* nas quinze localidades (Tabela 1). Significância do teste (1023 permutações). 29
- Tabela 7.** Diferenciação genética F_{ST} entre os pares de localidades de *J. acanthogaster*. Os números indicam as localidades (Tabela1). Nível de significância de $p < 0,05$ em 1000 permutações, *dados significativos. 30
- Tabela 8.** Diferenciação genética F_{ST} entre os pares de clados. Nível de significância de $p < 0,05$ em 1000 permutações, *dados significativos. 30

RESUMO

A moderna bacia do rio Paraguai drena uma área de cerca de 1,1 milhões de km² na América do Sul, com cabeceiras no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina, desaguando na bacia da Prata (Paraná-Paraguai). A bacia do Paraguai estende-se mais de 6.600 km de norte a sul, e 3.300 km de leste a oeste. Faz limite ao norte com as bacias do Tocantins, Xingu, Tapajós. Várias espécies de peixes distribuídas nos escudos não tem sua distribuição delimitada por divisores de bacias. Em vez disso, essas espécies ocorrem em mais de uma bacia hidrográfica, por exemplo, *Jupiaba acanthogaster*, que apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em riachos de várias drenagens do Planalto Central Brasileiro, incluindo as dos rios Paraguai, Tapajós, e Xingu. Os aspectos históricos que levaram a distribuição contemporânea dessa espécie e, conseqüentemente, das linhagens gênicas, podem ser identificados pela filogeografia. Dessa forma, o entendimento de tais processos torna possível a inferência de modelos hierárquicos de diferenciação genética e de estrutura filogeográfica, que refletem, assim, a história geográfica da região. As atuais distribuições geográficas de grupos endêmicos da América do Sul estão, presumivelmente, diretamente associados a tais eventos e podem ser investigados tendo como base o conhecimento sobre os padrões de organização filogenético das linhagens e interpretados a luz dos crescentes avanços na área de tectônica de placas e dos processos que remodelaram a paisagem sul-americana ao longo de todo o Cenozóico. Buscando respostas para essas questões, estudos filogenéticos utilizando marcadores moleculares têm colaborado para um maior entendimento dos padrões hierárquicos da ictiofauna, podendo corroborar hipóteses e auxiliar no esclarecimento de problemas biogeográficos ainda não resolvidos. É esperado que a utilização de marcadores moleculares, tais como o DNA mitocondrial (DNAm), informe os níveis mais profundos de divergência filogenética principalmente por apresentar uma evolução rápida nas populações da maioria dos animais e ser transmitido, raras exceções, pela linhagem materna, sem recombinação intermolecular, sendo por isso uma ferramenta muito utilizada em estudos filogenéticos a nível de populações. Para isso, nesse estudo, foram analisados 77 exemplares de *Jupiaba acanthogaster* coletados em 15 localidades distintas que abrangem as três bacias hidrográficas do estado de Mato Grosso (Alto Paraguai, Xingu e Tapajós), sendo sequenciado através do método enzimático o gene Citocromo Oxidase subunidade I do DNAm. As distâncias genéticas relativamente altas, a grande quantidade de haplótipos exclusivos, a formação de três conjuntos na rede haplotípica por muitos passos mutacionais, os valores de *Fst* significantes e a fixação de valores acima de oito passos mutações, indicam que as populações do Paraguai, Tapajós e Xingu estão se tornando evolutivamente distantes e que provavelmente não exista atualmente conectividade reprodutiva que possa produzir fluxo gênico entre elas.

Palavra-chave: Filogeografia, *Jupiaba acanthogaster*, Bacia do Alto Paraguai e Geologia.

ABSTRACT

The modern Paraguay river basin drains an area of about 1.1 million square kilometer in South America, with headwaters in Brazil, Bolivia, Paraguay and Argentina, flowing into the La Plata basin (Paraguay-Paraná). The Paraguay river basin extends over 6,600 km from north to south and 3,300 km from east to west. Along its north and northeastern borders, the Paraguay basin share headwater divides with the Tocantins, Xingu and Tapajós basins. Distributions of several freshwater fish species from the central Brazilian shield are not restricted to a single basin. Instead, these species occurs in more than one river basin, such as, *Jupiaba acanthogaster*, which presents a wide geographical distribution, occurring in several streams draining the Brazilian Central Plateau, including the Paraguay, Upper Tapajos, and Tocantins river basins. The historical aspects that led to the contemporary distribution of this species and consequently its genetic structure, can be identified by the phylogeography. Therefore, understanding these processes allow inferences on hierarchical models of genetic differentiation and phylogeographic structure, which reflect the geographical history of the studied taxa and region. The current geographical distribution of endemic groups in South America are presumably directly associated with such events and can be investigated based on the study of phylogenetic patterns among lineages and interpreted according to recent advances in the field of plate tectonics in South America throughout the Cenozoic. Phylogenetic studies using molecular markers have contributed to a better understanding of the hierarchical patterns of the fish fauna genealogy and distribution, and corroborate biogeographic hypotheses. It is expected that the use of molecular markers such as mitochondrial DNA (mt DNA) would tell the deepest levels of phylogenetic divergence by presenting a rapid evolutionary rates in animal populations and being transmitted mostly through maternal lineage, without recombination, consisting in a useful tool in phylogenetic studies at populations levels. In this study, 77 specimens of *Jupiaba acanthogaster* collected at 15 different locations in the Paraguay, Xingu and Tapajós basins were analyzed and sequenced using the enzymatic gene Cytochrome Oxidase subunit I of mt DNA. The relatively high genetic distances, large number of unique haplotypes, the formation of three sets in the haplotype network by many mutational steps, significant F_{st} values and setting values above eight-step mutations, indicate that the populations of Paraguay, Tapajos and Xingu are evolutionarily distinctly lineages without reproductive connectivity that can produce gene flow between them.

Keyword: Phylogeography, *Jupiaba acanthogaster*, Upper Paraguay river basin and Geology.

1. INTRODUÇÃO

A moderna bacia do rio Paraguai drena uma área de cerca de 1,1 milhões de km² na América do Sul, com cabeceiras no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina, desaguardo na bacia do Prata (Paraná-Paraguai). A bacia do Paraguai estende-se mais de 6.600 km de norte a sul, e 3.300 km de leste a oeste. Faz limite ao norte com as Bacias do Tocantins, Xingu, Tapajós, Guaporé e Marmoré.

A bacia do Paraguai drena a porção central da América do Sul há milhões de anos, e as origens das espécies aquáticas que habitam essa bacia tem sido objeto de investigação científica por mais de um século (CARVALHO e ALBERT, 2011).

A formação da ictiofauna da bacia do alto Paraguai teve influências de bacias vizinhas (HUBERT E RENNO, 2006; MENEZES et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2008). Carvalho e Albert (2011) revisaram as semelhanças entre as ictiofaunas da bacia do alto Paraguai e a bacia Amazônica. Acreditam que a composição taxonômica da bacia do Paraguai pode ser explicada em grande parte pela migração de peixes de cabeceiras sulistas afluente da bacia Amazônica: o Mamoré-Guaporé, Tapajós, Xingu, e Tocantins e, que a fauna de peixes de água doce do Paraguai não evoluiu em isolamento daquela de regiões adjacentes.

Várias espécies de peixes distribuídas no Planalto Central Brasileiro não tem sua distribuição delimitada por divisões de bacias. Em vez disso, essas espécies ocorrem em mais de uma bacia hidrográfica. *Jupiaba acanthogaster*, por exemplo, apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em riachos de várias drenagens do Planalto Central Brasileiro, incluindo a dos rios Paraguai, alto Tapajós, Xingu e Tocantins (LIMA e RIBEIRO, 2011), ocorrendo em rios que drenam o Escudo Brasileiro, em águas lólicas (LIMA e RIBEIRO, 2011). Este padrão de distribuição geográfica sugere a ocorrência de constantes trocas faunísticas entre bacias hidrográficas adjacentes graças à atividade neotectônica (RIBEIRO, 2006 e RIBEIRO et al., 2006).

A formulação e o teste de hipóteses gerais sobre a diversificação de peixes neotropicais requerem conhecimento sobre sua filogenia e distribuição no tempo e no espaço (LUNDBERG, 1998). Aspectos históricos que levaram à distribuição contemporânea das espécies, e consequentemente, das linhagens gênicas são enfocados pela filogeografia, uma subdisciplina da biogeografia (AVISE et al., 1987). O entendimento de tais processos torna possível a inferência de modelos hierárquicos de

diferenciação genética e de estrutura filogeográfica, que refletem, assim, a história geográfica da região (BEHEREGARAY et al., 2002).

Buscando respostas para essas questões, análises utilizando marcadores moleculares têm colaborado para um maior entendimento dos padrões filogenéticos da ictiofauna, podendo corroborar hipóteses e auxiliar no esclarecimento de problemas biogeográficos ainda não totalmente compreendidos. Para isso, a utilização de DNA mitocondrial (DNAm_t) nos oferece grandes contribuições para obter um maior entendimento dos padrões hierárquicos de distribuição geográfica. É esperado que ele nos informe os níveis mais profundos de divergência filogenética (SUNNUCKS et al., 2000) principalmente por apresentar uma evolução rápida nas populações da maioria dos animais e ser transmitido, com raras exceções, pela linhagem materna, sem recombinação intermolecular, sendo por isso uma ferramenta muito utilizada em estudos filogenéticos a nível de populações (AVISE et al., 1998).

O desenvolvimento de técnicas moleculares foi mais um pré-requisito importante para a filogeografia. Várias técnicas de análise estatística e desenvolvimento de alguns softwares possibilitaram a construção de árvores filogenéticas em nível intra-específico (populacional), a avaliação da diversidade de nucleotídeos e haplótipos, e distâncias genéticas, bem como a estimativa de diferentes parâmetros que descrevem a história demográfica dos grupos investigados (NEI, 2000).

Peixes de água doce são excelentes modelos de estudo para análises biogeográficas por apresentarem distribuições restritas a sistemas de drenagem de lagos e rios. Portanto sua evolução e eventuais eventos de vicariância e dispersão estão relacionadas com eventos paleogeográficos das bacias (DURAND et al., 1999; PFRENDER et al., 2004).

A história biogeográfica de *Jupiaba acanthogaster* reflete os principais eventos geológicos responsáveis por modelar a atual feição do Planalto Central Brasileiro. Para entender essa história complexa é necessário considerar alguns aspectos importantes da estrutura geológica do continente Sul-Americano e da forma como esta antiga estrutura responde às mais recentes forças globais tectônicas (LIMA e RIBEIRO, 2011).

O divisor de águas entre a bacia Amazônica e do Alto Paraguai é uma estrutura geomorfologicamente complexa, tanto em termos de sua geografia física quanto em termos de sua longa história tectônica. Os limites precisos das bacias e das suas várias sub-bacias têm, presumivelmente, se deslocados várias vezes ao longo dos milhões de anos (CARVALHO e ALBERT, 2011).

Os principais eventos responsáveis pela formação da bacia do Alto Paraguai foram à ruptura da Gondwana, e o soerguimento da cordilheira dos Andes, ao longo da margem ocidental da América do Sul, a partir da era Mesozoica (MCQUARRIE et al., 2005; UBA et al., 2006; RIBEIRO, 2007; MENEZES et al., 2008).

A ruptura da Gondwana desencadeou a separação dos Paleocontinentes Sul-Americano e Africano, e a formação do Oceano Atlântico, um processo gradativo que culminou a aproximadamente 90 Ma (CESERO e PONTE, 1997). Ao redor dos paleoplanaltos, houve a reativação de grandes faixas de rochas dobradas e falhas pré-cambrianas (RIBEIRO, 2007).

Concomitante ao processo de ruptura continental, a plataforma brasileira interagiu na sua margem oeste com a placa de Nazca, gerando a cordilheira dos Andes, desde o período Cretáceo. Ao longo do processo de soerguimento dos Andes, no Eoceno médio e Oligoceno inferior, a paleobacia do Alto Paraguai se estendeu para o oeste (ASSINE, 2004) e capturou fragmentos da paleodrenagem Amazônica, permitindo a troca de sua ictiofauna.

A origem da bacia do Alto Paraguai teve influências do processo de formação dos Andes, durante o Mioceno (ASSINE, 2004; UBA et al., 2006), na região sub-andina, ao sopé do cinturão dobrado que desenvolveu em um conjunto de terras baixas, em que terras altas adjacentes se incorporaram com o avanço da carga tectônica, a Bacia de Antepaís (LIMA e RIBEIRO, 2011). A Bacia de Antepaís desenvolveu-se como resultado da deformação da litosfera em resposta a flexão do encunhamento orogênico da supralitosfera e sublitosfera. Essa flexão da litosfera sob carga estática gerou baixa flexão proximal ao orógeno, que migra com o avanço da carga para o leste (UBA et al., 2006), formando o “Forebulge” (Arco flexural). Como a deformação do orógeno avançou para leste, os sedimentos dessa bacia foram incorporados ao Andes, e a bacia de Antepaís e o arco flexural migraram para o leste (LUNDBERG et al., 1998). Durante o último evento de compressão ao longo da faixa andina (~ 2,5 Ma), o Forebulge se encaixou nas falhas entre os paleoplanaltos (Crátons) originando o Pantanal Matogrossense (ASSINE, 2004).

Neste contexto, o estudo da filogeografia de *Jupiaba acanthogaster* pode contribuir para testar hipóteses sobre a formação da ictiofauna do alto Paraguai, que surgiu de uma história complexa dos sistemas fluviais, associada à bacia Amazônica, em relação à evolução paleográfica.

2. OBJETIVOS

Testar hipóteses que expliquem qual a sequência de eventos de vicariância na região do Planalto Central Brasileiro, decorrentes da história paleogeográfica da região, que ocasionaram a atual distribuição espacial e temporal nas populações de *Jupiaba acanthogaster*.

Os objetivos operacionais foram:

- a. Sequenciar segmentos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) do DNA mitocondrial de exemplares de *Jupiaba acanthogaster*;
- b. Inferir a distribuição espacial e temporal, verificando a estruturação haplotípica, sequência de eventos de vicariância, expansão e contração populacional, que as populações estudadas passaram ao longo de sua história evolutiva;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Espécimes Coletados.

Foram analisadas amostras de um total de 77 exemplares de *Jupiaba acanthogaster* (Figura 1) coletados em 15 localidades distintas (Tabela 1) que abrangem as três bacias hidrográficas do estado de Mato Grosso (do Paraguai, do Xingu e do Tapajós), assinalados na Figura 2. Um exemplar da espécie *Jupiaba polylepsi* foi analisado e utilizado como grupo externo. Foram obtidos fragmentos de tecidos de todos os espécimes a partir de nadadeira ou musculatura, os quais foram preservados em etanol absoluto à -20°C e depositados na coleção de tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Os exemplares foram fixados em formol 10% e conservados em álcool 70% sendo depositados na Coleção de Peixes do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brasil.



Figura 1. Exemplar de *Jupiaba acanthogaster* (Depositado na coleção de peixes da UFMT).

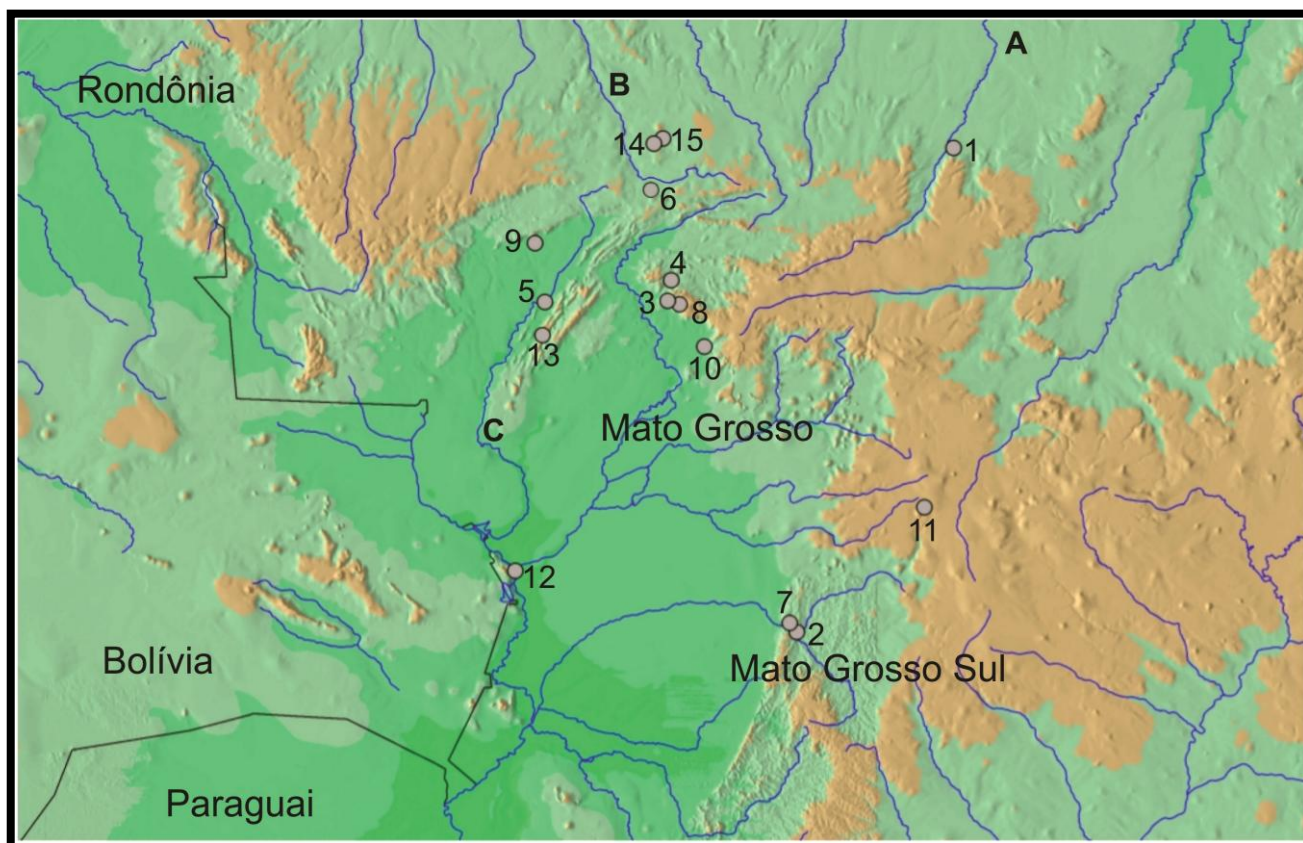


Figura 2. Região do Planalto Central Brasileiro e as localizações dos espécimes utilizadas no presente trabalho. Os números indicam os pontos de amostragem (1-Rio Culuene, 2- Córrego São Francisco, 3- Rio Cuiabá, 4- Rio Cóxipo-açú, 5- Rio Salobra, 6- Rio Taquari, 7- Ribeirão dos veados, 8- Rio Paciência, 9- Rio Angelim, 10- Rio Aricá-mirim, 11- Córrego Pinguela, 12- Rio Paraguai (Corumbá), 13-Rio Paraguai (S.Araras), 14- Rio dos Patos, 15- Rio Piquiri), e as letras os principais rios das bacias (A- Rio Xingu, B- Rio Arinos, C- Rio Paraguai) (as coordenadas geográficas estão listadas na Tabela 1).

Tabela 1. Relação de localidades dos exemplares utilizados nas análises filogenéticas e seus respectivos dados sobre localidade de coleta, e os números dos tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP, Campus Botucatu.

	Drenagem	Município	Latitude	Longitude	Números dos tecidos (LBP)
1	Rio Culuene	Paranatinga	-13° 50' 56.99"	-53° 15' 22.99"	50142 – 50146, 58240
2	Córrego São Francisco	Coxim I	-18°30'38.1"	-54°46'05.1"	14058
3	Rio Cuiabá	Cuiabá (Manso)	-15°19'7.16"	-56°00'31.8"	28212-28214
4	Rio Córrego-açú	Chapada dos Guimarães	-15°07.36'	-55°58.53'	36218-36222
5	Rio Salobra	Cáceres	- 15°19'53.5'	-57°11'31.1"	41778, 41781
6	Rio Taquari	Diamantino	-14°09'14.9'	-56°05'41.6"	43401
7	Ribeirão dos veados	Coxim II	-18°25'24.4"	-54°50'05.9"	49905,49907-49909
8	Rio Paciência	Cuiabá (Paciência)	-15° 21' 14.99"	-55° 53' 35.99"	50147 – 50151, 58243-58244
9	Rio Angelim	Nova Olímpia	-14° 45' 51.99"	-57° 17' 5.69"	50152 – 50156, 58248-58252
10	Rio Aricá-mirim	Santo Antônio	-15° 45' 43.99"	-55° 39' 16.99"	50167-50171,58263
11	Córrego Pinguela	Alto Araguaia	-17° 18' 37.11"	-53° 32' 22.81"	50172-50176,58269-58271
12	Rio Paraguai	Corumbá	-17°55'16.0"	-57°28'31.6"	56393-56394,56386-56397
13	Rio Paraguai	Serra das araras	-15° 39' 8.06"	-57° 12' 50.12"	58001-58005
14	Rio dos Patos	Nova Mutum I	-13° 45' 30.94"	-56° 3' 14.45"	50157-50161, 58253, 58257
15	Córrego Piquiri	Nova Mutum II	-13 ° 48'30,36"	-56°08'38,71"	50162-50166, 58258-58260,58262

3.2. Extração de DNA, PCR e Sequenciamento.

O DNA genômico total foi isolado de nadadeiras e/ou tecidos musculares de cada espécime usando os kits de extração de DNA DNeasy Tissue (Qiagen) e Phire Animal Tissue Direct PCR (Finnzymes), seguindo o protocolo recomendado pelos fabricantes. Um fragmento (~650 pb) do gene mitocondrial Citocromo c oxidase subunidade I (COI) foi amplificado por PCR usando o conjunto de *primers*: FishF1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e FishR1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (Ward et al. 2005). As PCR foram realizadas em um termociclador (MJ Research, INC, modelo PTC-100_ Programmable Thermal Controller) com volume final de reação de 12,5 µl, contendo 0,3 µl de dNTP (2Mm), 1,25µl 10X Taq buffer (50 mM KCl, 10mM Tris – HCl, 0.1% Triton X-100, and 1,5 mM MgCl₂), 0,3 µl de cada primer (10 µM), 0,7 µl MgCl₂ (50mM), 0,05 µl *Taq-Pht* DNA polymerase (5U), 1 µl de DNA (10-20 ng), e água ultrapura. As condições gerais de termociclagem consistiram em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos, extensão à 72°C por 60 segundos, seguidos de um passo final de extensão à 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram aplicados em um gel de agarose 1% para verificação do sucesso de amplificação e corados utilizando o corante *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia). O marcador de peso molecular conhecido, “1 Kb Plus”, foi utilizado para checar o tamanho do fragmento amplificado. Os produtos da PCR foram purificados com o kit comercial ExoSap-IT® (USB Corporation), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Os produtos amplificados e purificados foram utilizados como molde para as reações de sequenciamento, a qual foi realizada em um volume final de 7,0µl, contendo 0,7µl do Kit “*Big Dye TM terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystems), junto com 0,35µl (10µM) de um dos *primers*, 1,05µl de Tampão 5X, água e 1,4 µl de DNA molde. As condições da reação de sequenciamento consistiram em um ciclo inicial a 96°C por 120 segundos para desnaturação, seguido de 30 ciclos a 96°C por 45 segundos para desnaturação, 50°C por 60 segundos para anelamento dos *primers* e 60°C por 120 segundos para a extensão da cadeia. O produto da reação de sequenciamento foi purificado com Acetato de Sódio/ Ácido tetracético etilenodiamino/ Álcool seguindo o protocolo sugerido no Kit “*Big Dye TM terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready*

Reaction” (Applied Biosystems). Todas as amostras foram sequenciadas no sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Todas as sequências futuramente serão depositadas no GenBank e no Barcode of life Data Systems (Project EFUPR).

3.3. Análise dos dados

3.3.1 – Análise das sequências de DNA

As sequências obtidas foram analisadas com o software SeqScape® v2.6 (Applied Biosystems) para obtenção das sequências consenso e checar a ocorrência de deleções, inserções e stop códons. As sequências foram alinhadas usando a versão online do algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) disponível no site (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Foram calculados os valores de distância genética entre e dentro dos grupos observados no dendrograma de Neighbor-Joining (NJ) usando o modelo de distância K2P no programa MEGA 5.0.

3.3.2 - Análises Populacionais

A análise de variância molecular (AMOVA), implementada no software ARLEQUIN 3.5.1.2 (EXCOFFIER et al., 2005), foi realizada para verificar a proporção da variação genética encontrada entre os grupos, entre as localidades dentro dos grupos e dentro das localidades. Os cálculos foram baseados no índice de estruturação genética F_{ST} e a estruturação em grupos correspondeu à observada no dendrograma de NJ obtido. O grau de estruturação genética entre as localidades foi obtido pelo índice F_{ST} , calculado para cada par de localidades com significância de $p < 0,05$ e com 1023 permutações (EXCOFFIER et al., 2005).

3.3.4 - Análise Filogeográfica

Foi construída uma rede de haplótipos com o auxílio do programa Network 4.5.1.6 (FLUXUS TECHNOLOGY LTDA, 2009) para inferir as relações evolutivas entre os haplótipos obtidos.

Para verificar as relações entre os espécimes analisados foi construído um dendrograma pelo método de Neighbor-Joining (NJ) e uma árvore de Máxima Parcimônia (MP), utilizando-se o modelo de evolução Kimura-2-Parâmetros (K2P)

(KIMURA, 1980) com o software Mega 5.0 (TAMURA et al., 2011). Para testar a robustez, do dendrograma obtido pela análise de Neighbor-Joining e da árvore de Máxima Parcimônia, foi aplicado o método de *bootstrap* utilizando 1000 pseudo-réplicas em ambas às análises.

A rede de haplótipos e a árvore de MP foram utilizadas na construção de um cladograma resolvido de área, por reconstrução manual, inferindo relações entre a história geográfica, temporal e de distribuição das populações analisadas. Este cladograma de área foi utilizado para se estabelecer hipóteses que expliquem a história evolutiva da região e assim explicar o padrão de distribuição atual da espécie *Jupiaba acanthogaster*.

4. RESULTADOS

Foram obtidas as sequências parciais do gene mitocondrial COI de 77 espécimes, de 15 localidades (Figura 2). O tamanho médio das sequências obtidas foi de 644 pb. A composição média de bases para este fragmento do gene COI nas amostras estudadas foi de 22,36% de adenina (A), 28,29% de citosina (C), 20,19% de guanina (G) e 29,14% de timina (T). Nenhuma das sequências apresentou stop-códons, inserções ou deleções.

Inicialmente foram obtidos os valores de distância genética K2P para as 16 localidades amostradas, as 15 localidades mais o grupo externo, os quais apresentaram valores variando de 0,1% (GP2XGP3; GP9XGP14; GP9XGP15) a 5,5% (GP1xGP7) (Tabela 2).

Tabela 2. Distância genética K2P obtida entre as 15 localidades amostradas (Os números indicam as localidades (Tabela 1)). Em negrito, o valor médio da distância genética observada dentro de cada localidade. Linha 16 = comparação com grupo externo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0,003															
2	0,055	-														
3	0,050	0,017	0,001													
4	0,050	0,018	0,001	0,000												
5	0,052	0,004	0,015	0,015	0,002											
6	0,051	0,005	0,016	0,016	0,006	-										
7	0,051	0,008	0,016	0,017	0,008	0,004	0,006									
8	0,044	0,022	0,009	0,009	0,020	0,020	0,020	0,015								
9	0,049	0,005	0,013	0,013	0,003	0,004	0,006	0,017	0,001							
10	0,051	0,021	0,008	0,009	0,019	0,020	0,020	0,014	0,017	0,010						
11	0,051	0,003	0,014	0,015	0,004	0,002	0,004	0,019	0,002	0,018	0,000					
12	0,049	0,005	0,013	0,013	0,003	0,004	0,006	0,017	0,001	0,016	0,002	0,001				
13	0,049	0,005	0,012	0,013	0,002	0,003	0,005	0,017	0,001	0,016	0,002	0,000	0,000			
14	0,051	0,027	0,024	0,025	0,024	0,025	0,024	0,028	0,022	0,024	0,023	0,022	0,022	0,000		
15	0,052	0,027	0,023	0,023	0,024	0,025	0,024	0,026	0,022	0,023	0,023	0,022	0,022	0,003	0,005	
16	0,270	0,279	0,279	0,280	0,278	0,279	0,284	0,277	0,277	0,278	0,279	0,277	0,276	0,272	0,272	-

O dendrograma de NJ obtido mostrou que estas 16 populações se dividem em três grandes grupos principais (Figura 3), com altos valores de suporte, os quais foram denominados de grupos A, B e C (Figura 3). Com este resultado, as localidades foram reagrupadas dentro desses três grupos principais para as análises posteriores. Os valores de distância genética K2P obtidos entre os grupamentos A, B e C foram de 4,9% (CxA), 2,4% (CXB) e de 5,1% (BxA) (Tabela 3). A valor médio da distância genética K2P dentro de cada grupo variou de 0,3% a 1,0% (Tabela 3).

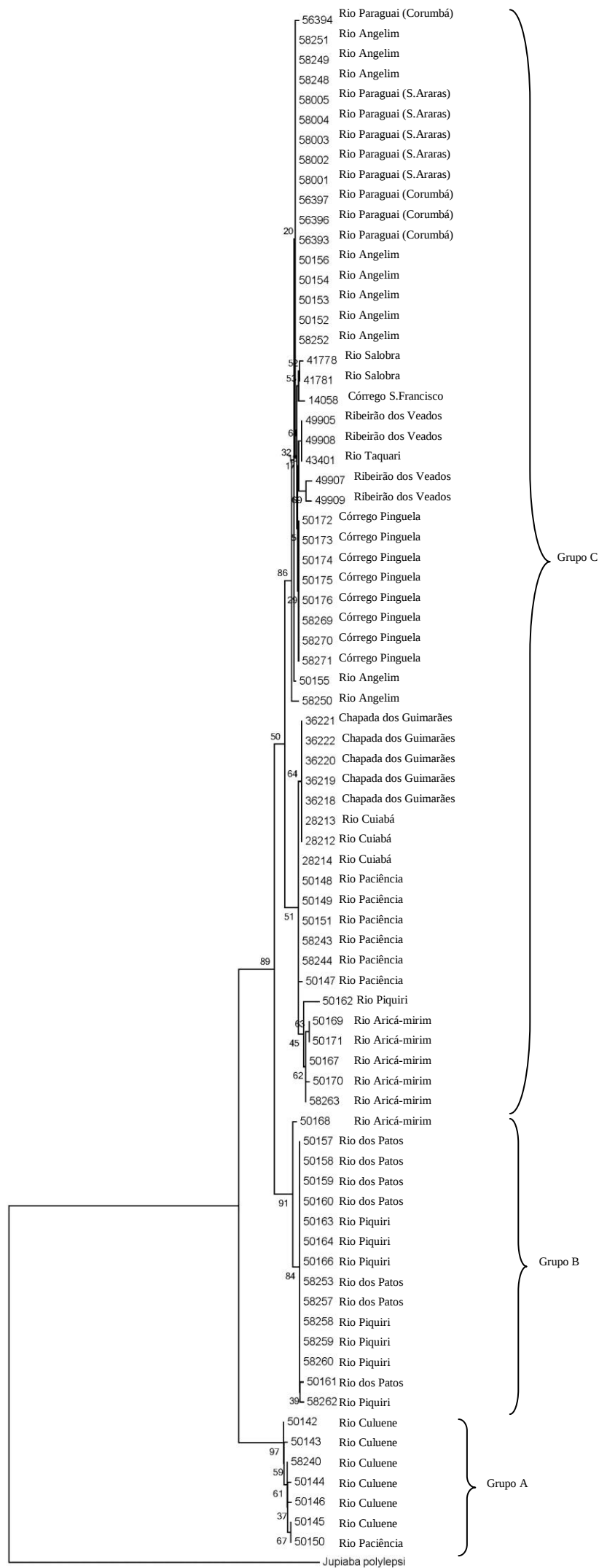


Figura 3. (Página anterior) Dendrograma de Neighbor-joining obtido a partir das sequências parciais do gene COI evidenciando a presença de três grupos (A(B+C)). Os valores acima dos nós representam o suporte estatístico de NJ bootstrap (1000 pseudo-réplicas). Os números dos peixes representam os números dos seus respectivos vouchers, e na frente à drenagem da coleta.

Tabela 3. Distâncias genéticas K2P obtidas entre os três grupos formados (Grupo A é formado pela população 1; o Grupo B pelas localidades 14 e 15; o Grupo C pelas localidades 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 e 13 e o OUT representa o grupo externo (*J. polylepis*)). Em negrito está o valor médio da distância genética K2P obtida dentro de cada grupo.

	Grupo C	Grupo A	Grupo B	Group Out
Grupo C	0,010			
Grupo A	0,049	0,003		
Grupo B	0,024	0,051	0,003	
Grupo externo	0,278	0,270	0,272	-

4.1. Análise Populacional

A diversidade nucleotídica geral (π) foi de 0,0027821 e a diversidade haplotípica (Hd) foi de 0,580586 (Tabela 4).

As sequências obtidas definiram 29 haplótipos, não sendo observado nenhum haplótipo comum a todas as localidades amostradas. O haplótipo 15 foi compartilhado entre três localidades (Rio Angelim, Rio Paraguai (Corumbá) e Rio Paraguai (Serra das Araras)), sendo o mais frequente. Os haplótipos 4-5, 7-8, 9-10-11-13-26, 16-28 e 20-21-22-23 foram exclusivo a uma única localidade, sendo Rio Cuiabá, Rio Salobro, Ribeirão dos Veados, Rio Culuene, Rio Angelim, Rio dos Patos e Rio Aricá-mirim, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 4. Diversidade genética observada nas diferentes localidades de *J. acanthogaster* (Tabela 1). N= tamanho de amostra; H= número de haplótipos; Hd= diversidade haplotípica; Pi (π)= diversidade nucleotídica.

Localidades	N	H	Hd	Pi (π)
1	6	6	1.000	0.002903
2	1	1	1.000	0.000
3	3	2	0.6667	0.001037
4	5	1	0.000	0.000
5	2	2	1.000	0.001555
6	1	1	1.000	0.000
7	4	3	0.8333	0.005443
8	7	4	0.7143	0.014219
9	10	3	0.3778	0.001175
10	6	4	0.8667	0.009124
11	8	1	0.000	0.000
12	4	2	0.5000	0.000778
13	5	1	0.000	0.000
14	7	2	0.2857	0.000444
15	8	3	0.4643	0.005054

Tabela 5. Distribuição das amostras de acordo com as localidades (Tabela 1) e haplótipos de *Jupiaba acanthogaster*. (-) haplótipos não encontrados.

Localidades	Haplótipos																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	2	1	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Total	1	7	5	1	1	3	1	1	1	1	1	2	1	1	16	1	12	1	1	2	1	2	1	8	1	1	1	1	1

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) considerando os três grandes grupos formados (Grupos A, B e C) mostrou que as variações são maiores entre os grupos do que dentro de cada grupo e entre as localidades dentro de cada grupo (Tabela 6), ou seja, existe um maior percentual de variação entre os grupos.

Os valores de estruturação genética de F_{ST} par-a-par demonstraram a ocorrência de subdivisão nas localidades que foi significativa ($p < 0,05$) entre alguns pares de localidades de *Jupiaba acanthogaster*, com valores variando de $-0,555$ a $1,000$ (Tabela 7). A análise de estruturação genética F_{ST} par a par considerando-se os grupos A, B e C apresentou valores altamente significativos ($p < 0,05$) variando de $0,655$ a $0,937$ (Tabela 8).

Tabela 6. Análise da variância molecular (AMOVA), F_{ST} , F_{CT} e F_{SC} entre as localidades de *J. acanthogaster* nas quinze localidades (Tabela 1). Significância do teste (1023 permutações).

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre os grupos	2	253.515	6.87518 Va	69.49
Entre localidades dentro dos grupos	12	122.119	1.89665 Vb	19.17
Dentro das localidades	62	69.561	1.12195 Vc	11.34
Total	76	445.195	9.89378	
F_{ST}: 0.88660		F_{CT}:0.69490		F_{SC}:0.62832

Tabela 7. Diferenciação genética F_{ST} entre os pares de localidades de *J. acanthogaster* . Os números indicam as localidades (Tabela1). Nível de significância de $p < 0,05$ em 1000 permutações, *dados significativos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.00000														
2	0.94227	0.00000													
3	0.94830*	0.94286	0.00000												
4	0.96473*	1.00000	0.18919	0.00000											
5	0.94436*	0.60000	0.92336	0.98073*	0.00000										
6	0.93636	1.00000	0.93103	1.00000	0.77778	0.00000									
7	0.91487*	0.39130	0.76471*	0.85149*	0.51958	-0.55556	0.00000								
8	0.77472*	0.36634	-0.10546	0.09410*	0.43706	0.25581	0.44281*	0.00000							
9	0.95916*	0.82828	0.90541*	0.93625*	0.72689*	0.68519	0.54762*	0.58701*	0.00000						
10	0.87015*	0.58095	0.22034*	0.41281*	0.61630*	0.51111	0.59414*	0.09313*	0.73261*	0.00000					
11	0.97338*	1.00000	0.98269*	1.00000*	0.96253*	1.00000	0.54161*	0.62205*	0.70428*	0.77033*	0.00000				
12	0.95280*	0.88235	0.92835*	0.97396*	0.76879*	0.77778	0.42857*	0.46039*	0.00210	0.63303*	0.87335*	0.00000			
13	0.96349*	1.00000	0.97079*	1.00000*	0.91597*	1.00000	0.51613*	0.50380*	-0.03659	0.68101*	1.00000*	0.06250	0.00000		
14	0.96587*	0.98333	0.97418*	0.98869*	0.97504*	0.98113	0.90340*	0.71795*	0.95757*	0.80255*	0.99067*	0.97329*	0.98698*	0.00000	
15	0.91026*	0.81022	0.81169*	0.85673*	0.81439*	0.78512	0.77017*	0.61988*	0.86011*	0.67669*	0.88496*	0.82265*	0.84606*	-0.01538	0.00000

Tabela 8. Diferenciação genética F_{ST} entre os pares de clados. Nível de significância de $p < 0,05$ em 1000 permutações, *dados significativos.

CLADO	A	B	C
A	0.00000		
B	0.93694*	0.00000	
C	0.80646*	0.65518*	0.00000

4.2 – Análise Filogeográfica

A rede de haplótipos (Figura 4) confirmou a presença de três agrupamentos (Grupos A; B; C), os quais são separados por 23 (AxC), 34 (AxB) e 8 (CxB) passos mutacionais (Figura 4). As localidades dentro de cada grupo apresentaram haplótipos relacionados, alguns até mesmo compartilhados, evidenciando o grau de relacionamento entre as mesmas. Estes resultados corroboram aos observados nas análises de distância genética K2P, populacionais e com o dendrograma de Neighbor-Joining obtido.

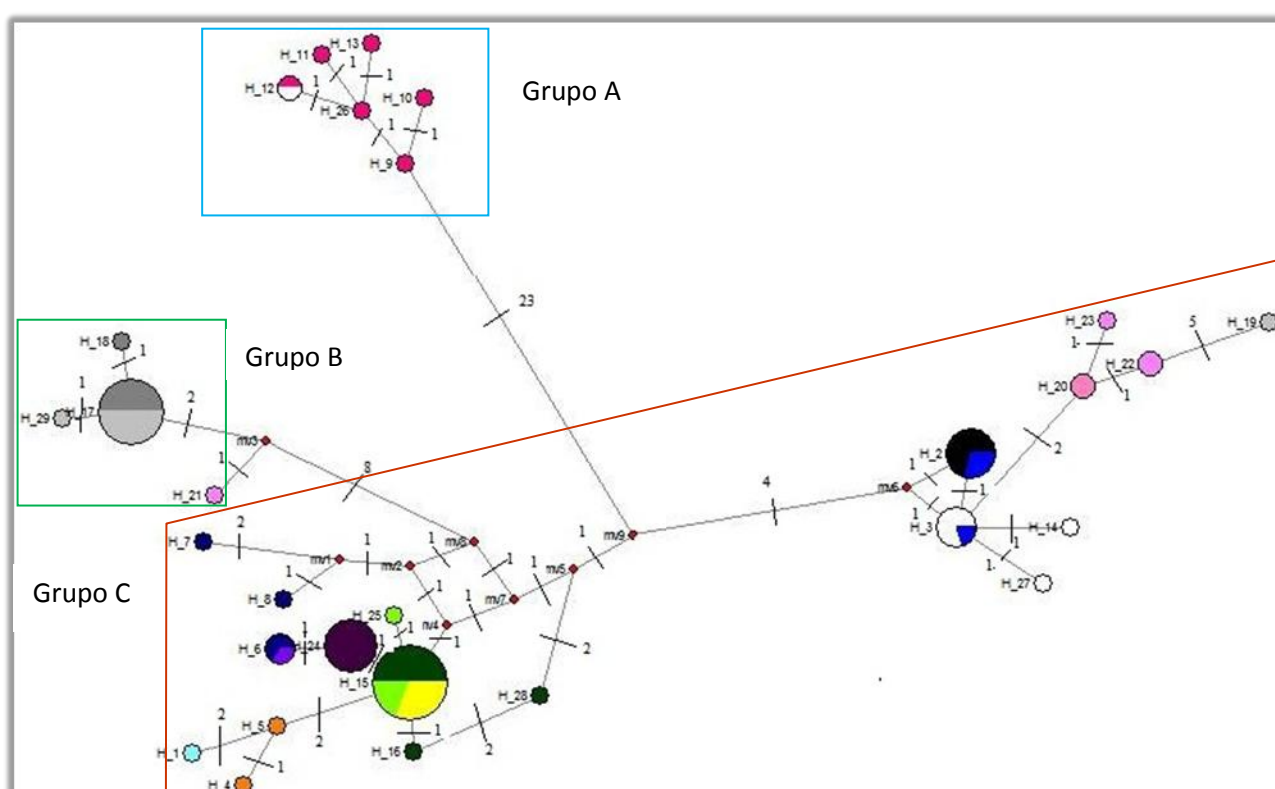


Figura 4. Rede de Haplótipos com agrupamentos de localidades de coleta formando três áreas geográficas (GRUPO A;B;C), os riscos com números indicam os passos mutacionais de uma haplótipo ao outro, os círculos indicam os haplótipos e a cor, a localidade que ele está presente. GRUPO A= AZUL (1: Rosa Escuro) ; GRUPO B = VERDE (14: Cinza Escuro e 15:Cinza Claro) e GRUPO C= VERMELHO (2:Azul Claro; 3:Azul Médio; 4: Preto; 5: Laranja.; 6:Roxo Claro; 7: Azul Escuro; 8: Branco; 9: Verde Escuro; 10:Rosa Claro; 11:Roxo Escuro; 12:Verde Claro; 13: Amarelo). Os números indicam as localidades (Veja a Tabela 1).

Na análise de máxima parcimônia atingiu uma topologia semelhante com o dendrograma de Neighbor-Joining, com pequenas diferenças na posição de alguns táxons. Na árvore, também foi possível distinguir três grandes grupos, muito bem suportados. O primeiro corresponde ao grupo "A" (Xingu), o "B" (Tapajós) e o "C" (Alto Paraguai) (Figura 5).

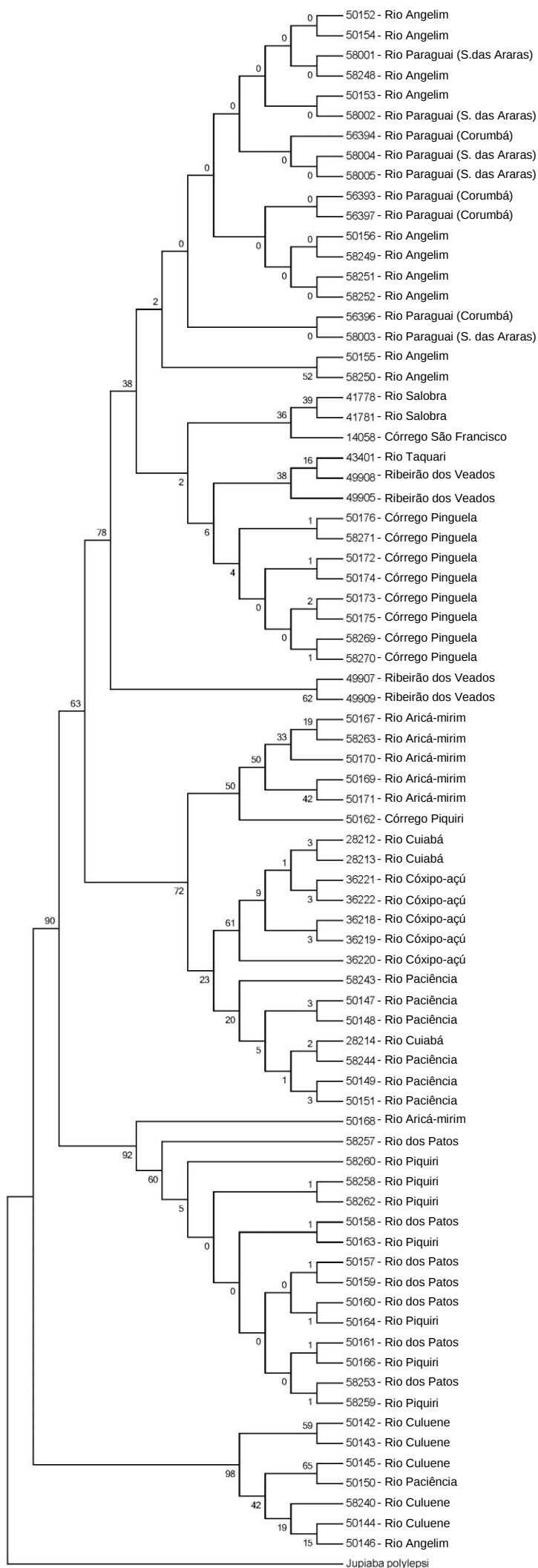


Figura 5. (Página anterior) Árvore filogenética de *Jupiaba acanthogaster* obtido a partir da análise de Máxima Parcimônia. Os valores acima dos nós representam o suporte estatístico de MP bootstrap (1000 pseudo-réplicas). Os números dos peixes representam os números dos seus respectivos vouchers, e na frente à drenagem da coleta.

O Cladograma de áreas evidência as relações entre as áreas em, que as localidades de *Jupiaba acanthogaster* ocorrem, formando três clados (GRUPO A = XINGU; GRUPO B= TAPAJÓS; GRUPO C= ALTO PARAGUAI)), representado na Figura 6.



Figura 6. Cladograma de área com base na análise de Máxima Parcimônia e distribuição da espécie de *Jupiaba acanthogaster*. Os retângulos indicam os Grupos.

5. DISCUSSÃO

O DNAm^t é reconhecido como uma excelente ferramenta para se analisar diferenças genéticas em populações animais (AVISE, 2000) e os resultados desse estudo, com as sequências parciais de COI de 77 amostras da espécie *Jupiaba acanthogaster*, corroboram essa afirmativa. Foi utilizada a análise de variância molecular, AMOVA, que encontrou altos índices de estruturação entre os três clados ($F_{st} \approx 0,89$), com o percentual de variação entre eles de 69,49. Nas análises entre os pares, os índices de estruturação apresentaram diferenças com forte estruturação entre os grupos, porém com uma maior diferenciação entre A e B ($F_{st} \approx 0,94$) e distância genética ($K2P=0,051$). E uma maior relação entre B e C mostrado pelo menor índice de distanciamento genético ($F_{st} \approx 0,65518$) e distância genética ($K2P=0,024$). Uma diferenciação com um nível intermediário foi observado entre A e C ($F_{st} \approx 0,81$) e distância genética ($K2P=0,049$). Considerando que, a amplitude dos valores de F_{st} seja, de 0 a 0,05 indicando uma pequena diferenciação genética; de 0,005 a 0,15 moderada; de 0,15 a 0,25 grande; e $>0,25$ indicam diferenciação genética muito grande (HARTL e CLARK, 2010), os valores de F_{st} dos três grupos apresentaram níveis de divergências muito grande, compatíveis com a delimitação de três possíveis espécies distintas. Não sendo evidenciadas ao identificar os espécimes, por não apresentarem diferenças significantes na parte morfológicas. O que foi observado em populações de *Piabina argentea* da Bacia do Alto Paraná, no qual os índices de F_{st} foram utilizados para caracterizar a existência de sete diferentes espécies (PEREIRA et al., 2011).

A árvore de MP apresentou topologia semelhante ao dendrograma de Neighbor-Joining. Porém, os nós com baixos valores de bootstrap, alguns iguais a zero, que são, provavelmente, devido a esses indivíduos serem da mesma espécie. As topologias observadas entre o dendrograma de NJ, a árvore de Máxima Parcimônia, o cladograma de áreas, e a rede de haplótipos originadas a partir de sequências parciais do gene COI evidenciaram os níveis de relacionamentos entre as localidades de *Jupiaba acanthogaster* e possibilitou a visualização das diferenças entre os clados com alto grau de significância nos valores de bootstrap nos ramos do dendrograma e na rede haplotípica com um número significativo de passos mutacionais entre os haplótipos de clados distintos. Desta forma, foi constatada uma maior semelhança genética entre os grupos B e C. Sendo A, embora com uma distância maior, também mais relacionado à C do que o B. A presença de haplótipos únicos em algumas populações, como de *Jupiaba acanthogaster*, sugere que pode estar em curso alguma diferenciação entre essas localidades (TEMPLETON, 2006).

As distâncias genéticas relativamente altas, a grande quantidade de haplótipos exclusivos, a formação de três conjuntos na rede haplotípica por muitos passos mutacionais, os valores de *Fst* significantes e a fixação de valores acima de oito passos de mutações, indicam que as localidades do Paraguai, Tapajós e Xingu estão se tornando evolutivamente distantes e que não exista conectividade reprodutiva que possa produzir fluxo gênico entre elas.

Os resultados do presente estudo apontam para uma sequência de eventos cladogenéticos que, provavelmente, envolvem inicialmente um evento mais antigo que ocasionou a separação da Bacia do Rio Xingu (Grupo A) da paleobacia, formada pelos Grupos B ($K2P=0,051$) e C ($K2P=0,049$) (Bacia dos Tapajós e do Alto Paraguai, respectivamente). E um evento mais recente, entre as Bacias dos Tapajós (Grupo B) e do Alto Paraguai (Grupo C) ($K2P=0,024$), sendo demonstrada a relação entre essas bacias através do cladograma de áreas (Figura 6) e nas distâncias genéticas entre os grupos.

O principal evento geológico que ocasionou a separação dos Grupos B e C foi à expansão da Bacia de antepaís (Chaco) e do arco flexural (Pantanal), que tornou o Pantanal, uma barreira ecológica para algumas espécies, relictuais, que apresentam sua distribuição periférica ao Pantanal como a de *Jupiaba acanthogaster*, revisada por Lima e Ribeiro (2011) (Figura 7), e *Oligosarcus pinto* (RIBEIRO, 2007).

Uma forte evidência desses eventos geológicos que culminaram na separação de áreas planálticas por áreas de planícies, do afundamento tectônico de antigas áreas planálticas sob efeito da reativação de antigas falhas são percebidas a partir de comparações geomorfológicas entre as Serras da Província Serrana (Serra das Araras) e Chapada dos Guimarães. De acordo com Ross (1991), estas duas regiões serranas constituídas de planaltos relictuais, hoje separadas pela depressão tectônica do Alto Paraguai constituem-se em áreas topograficamente continuas, dadas as similaridades geológicas e geomorfológicas entre estas duas regiões.

Outra evidência é a presença de espécies compartilhadas entre dois ou mais sistemas hidrogeográfico, que pode ser atribuída às espécies que estavam presentes em uma paleo-área que abrange ambas as bacias antes da manifestação do processo geológico/histórico responsável por configurar a presente arquitetura da bacia observada, sugerindo um modelo de simples vicariância (LIMA e RIBEIRO, 2011). A origem de alguns táxons da bacia do alto Paraguai poderem ser associados a estas alterações hidrogeográficas tardias do Plioceno, como a bacia de antepaís do Pantanal, que capturou

alguns afluentes ocidentais do Tocantins, alto Paraná e Paraguai superior (MENEZES et al., 2008).

Eventos recentes de divisão entre as bacias Amazônia e do Paraguai também podem ter ocorrido, delimitando novas fronteiras e bacias hidrográficas (WILKINSON et al., 2006). Como exemplificado por Menezes et al., (2008) e Rodriguez et al., (2008), e pelas relações de área apresentados em Hubert e Renno (2006) e López et al., (2008).

Hubert e Renno (2006) propuseram duas rotas de dispersão entre as bacias Amazônica e do alto Paraguai, indicados pela presença de espécies compartilhadas. Eles encontraram a unidade geográfica Tapajós dentro da área Tocantins-Xingu de endemismo aliada com a unidade geográfica do Paraguai. Este resultado deriva da presença compartilhada de espécies restritas às cabeceiras do Paraguai e Tapajós.

Carvalho e Albert (2011), revisando o trabalho de Pearson (1937), indicaram a semelhança da ictiofauna do Paraguai com a ictiofauna Amazônica, sugerindo a origem partir da Amazônia. Esta hipótese faz várias previsões filogenéticas e biogeográficas, sendo testada através da utilização de clados de peixes para os quais existam dados adequados, e em cladogramas de áreas com base na filogenia de diferentes taxa, indicando que a diversificação inicial da maioria destes grupos realizou-se na bacia Amazônica. Vários grupos são diversos em número de espécies na bacia amazônica e tem uma única espécie na bacia do Paraguai, que indica uma provável direção de dispersão da drenagem Amazônica para a Paraguaia, como o gênero *Hypoptopoma*, Loricariidae, que apresenta seis espécies na Bacia Amazônica, e apenas uma única espécie no sistema Paraguai-Paraná (SCHAEFER, 2003b). Do mesmo modo, que *Hypoptopoma*, existem alguns gêneros que são diversificados na Amazônia, mas têm apenas uma única espécie na bacia do Paraguai, como o *Pamphorichthys*, Poeciliidae, (LUCINDA, 2003); *Trachydoras*, Doradidae, (SABAJ e FERRARIS, 2003); *Xenrobrycon*, (WEITZMAN, 1987; MOREIRA, 2005), *Brachychalcinus*, *Poptella*, Characidae (REIS, 1989) e o gênero da espécie em estudo, *Jupiaba* (ZANATA, 1997), que apresenta em torno de 28 espécies e apenas uma única compartilhada entre as Bacias Amazônica-Paraguai, *Jupiaba acanthogaster*.

O estudo filogeográfico com *Jupiaba acanthogaster* infere que a ictiofauna da bacia do Paraguai, pelo menos para seus componentes associados e restritos às áreas planálticas da bacia, é formada principalmente por componentes de táxons compartilhados com os planaltos amazônicos adjacentes, em menor grau com a bacia do Prata. Assim, a filogenética e dados biogeográficos sugerem uma história complexa de vicariância e

dispersão entre várias bacias hidrográficas, combinados com a evolução da ictiofauna da bacia do alto Paraguai.

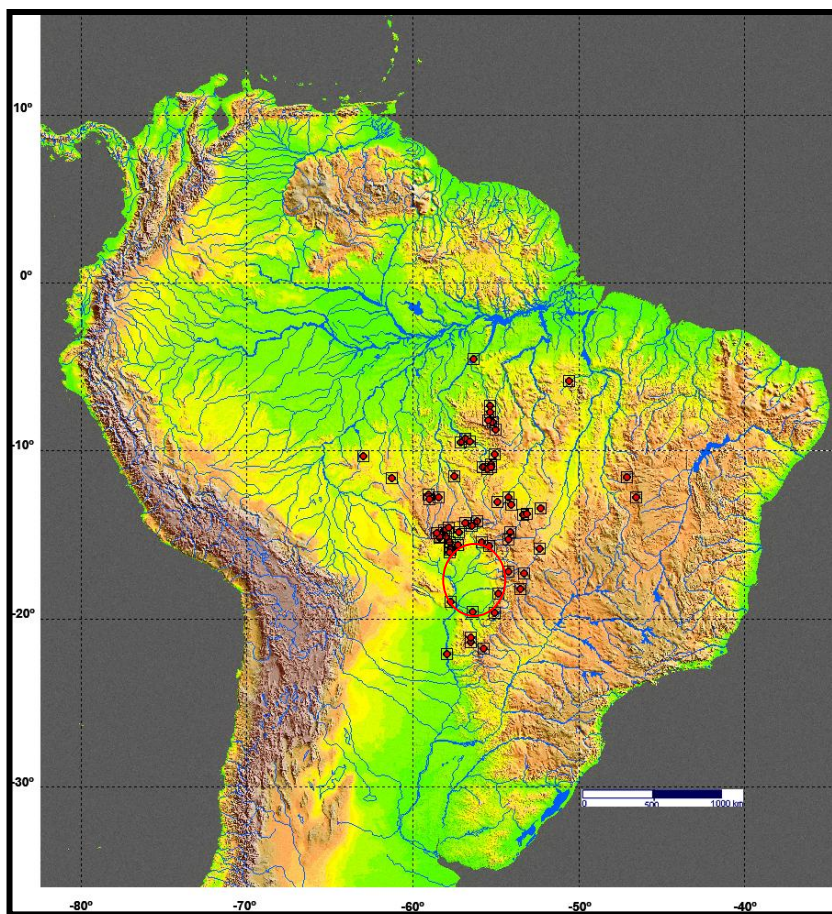


Figura 7. Distribuição de *Jupiaba acanthogaster* (pontos vermelhos). A área circundada de vermelho é a região do Pantanal.

6. CONCLUSÃO

Os estudos moleculares com os segmentos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) do DNA mitocondrial, dos exemplares de *Jupiaba acanthogaster*, forneceram evidências de um isolamento entre os grupos (A, B e C), que limitou o fluxo gênico entre as localidades estudadas, podendo caracterizar cada grupo como uma espécie.

O estudo filogeográfico com *Jupiaba acanthogaster* apontou uma sequência de eventos cladogenéticos, que ocasionou a separação do grupo A dos grupos B e C, e uma separação recente entre os grupos B e C, decorrente da migração da bacia de antepaís e do arco flexural para o leste, formando o Pantanal. Sendo evidenciado pela composição da ictiofauna da bacia do Paraguai, de áreas planálticas, que é formada principalmente por componentes de táxons compartilhados com os planaltos amazônicos adjacentes

Há necessidade de ampliar os estudos devido a outros trabalhos evidenciarem uma grande relação na distribuição de espécies, por exemplo, na Bacia do Guaporé e do Paraguai.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSINE, M. L. A bacia sedimentar do Pantanal Mato-Grossense. In Geologia do Continente Sul-Americano: Evolução da Obra de Fernando Flávio Marques de Almeida. Editado por V. Mantesso-Neto, A. et al., Beca, São Paulo, Brazil. 2004. Cap. 04, p. 61–74.

AVISE, J. C. et al. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, vol.18, p.489–522, 1987.

BEHEREGARAY, L.B.; SUNNUCKS, P.; BRISCOE, D.A. A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proc Biol Sci*, p.65-73, 2002.

CARVALHO, T.P.; ALBERT, J.S. The Amazon-Paraguay Divide. In: ALBERT, J.S. et al. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater fishes* (1ª Ed). University of California Press. Berkeley, Angeles e London. 2011. Cap.11, p. 193-202.

CESERO, P. e PONTE, F. C.. Análise comparativa da paleogeologia dos litorais atlânticos brasileiro e africano. *Boletim de Geociências, PETROBRAS*, n.11, vol.1, p.1-18. 1997

DURAND, J.D.; TEMPLETON, A.R.; GUINAND, B., IMSIRIDOU, A.; BOUVET, Y. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chub, *Leuciscus cephalus* (Teleostei, Cyprinidae), in Greece: implications for Balkan Peninsula biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol.13, p.566–580, 1999.

EDGAR. EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. Genome Campus. Hinxton, Cambrigde. UK. disponível no site (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). 2004. Acesso dia 27 de Fev.2011.

EXCOFFIER, L. et al. An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, vol.1, p.47-50, 2005.

FLUXUS TECHNOLOGY LTD. NETWORK, versão 4.6.1.0. All rights reserved. Map copyright 2005. The living earth.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. *Princípios de genética de populações* [trad. EIZIRIK et al.] 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660p.

HEBERT, P. D. N. et al. Identification of birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol.*, vol.2, p.1567-1663, 2004a.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L. Biological identification through DNA barcodes. *Pro.Roy.Soc.London.Ser.B*. vol.270, p. 313–321. 2003.

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

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through 332 comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.*, n.16. vol.2, p.111-120, 1980.

LIMA, F.C.T.; RIBEIRO, A.C. Continental-Scale Tectonic Controls of Biogeography and Ecology. In: ALBERT, J.S. et al. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater*

fishes (1ª Ed). University of California Press. Berkeley, Angeles e London. 2011. Cap.09, p. 145-164.

LÓPEZ, H. L. et al. Biogeographical revision of Argentina (Andean and Neotropical Regions): An analysis using freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, vol.35, p.1564–1579. 2008

LUCINDA, P. H. F. Family Poeciliidae. In *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Editado por REIS, S.O. et al. Porto Alegre: Edipucrs. P.555–581, 2003

LUNDBERG. The Temporal Context for the Diversification of Neotropical Fishes. In: MALABARBA, L.R. et al. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, p. 603,1998.

MCQUARRIE, N. et al. Lithospheric evolution of the Andean fold-thrust belt, Bolivia, and the origin of the central Andean plateau. *Tectonophysics*, vol. 399, p.15–37, 2005.

MENEZES, N. A. et al. Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: Phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. *Zootaxa*, vol.1726, p.33–48, 2008.

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

MOREIRA, C. R. *Xenurobrycon coracoralinae*, a new glandulocaudine fish Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from central Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, vol.118, p.855–862, 2005.

PEARSON, N. E. The fishes of the Beni-Mamoré and Paraguay basin, and a discussion of the origin of the Paraguayan fauna. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, vol.23, p. 99–114, 1937.

PEREIRA, L.H.G.; PAZIAN, M.F.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*, vol.22, p.87-96, 2011.

PFRENDER, M.E.; HICKS, J.; LYNCH, M. Biogeographic patterns and current distribution of molecular genetic variation among populations of speckled dace, *Rhinichthys osculus* (Girard). *Mol. Phylogenet. Evol.* n.30, p. 490–502, 2004

POTTER, P. E. The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: A natural history. *Journal of South American Earth Sciences*, vol.10, p.331–344, 1997.

REIS, R. E. Systematic revision of the Neotropical characid subfamily Stethaprioninae (Pisces, Characiformes). *Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, série*

RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: An example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, vol.4, p.225–246, 2006.

RIBEIRO, A. C. et al. Fishes of the Atlantic Rainforest of Boracéia: Testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, vol.17, p.157–164, 2006.

RIBEIRO, A.C. Filogenia e biogeografia do gênero *Oligosarcus* Günther, 1864 (Ostariophysi; Characidae). 2007. 135f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.

RODRIGUEZ, M. S.; REIS, R. E. Taxonomic review of *Rineloricaria* (Loricariidae: Loricariinae) from the Laguna dos Patos drainage, southern Brazil, with the descriptions of two new species and the recognition of two species groups. *Copeia*, vol.2008, p.333–349, 2008.

ROSS, J.L.S. O contexto geotectônico e a morfogênese da Província Serrana de Mato Grosso. *Rev.IG*, n°.12, vol.2, p.21-37, 1991.

SABAJ, M. H.; C. J. FERRARIS, Jr. Family Doradidae (Thornyc catfishes). In *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*, edited by R. E. REIS, S. O.

SEMPERE, T. et al. Late Oligocene– Early Miocene major tectonic crisis and related basin in Bolivia. *Geology*, vol.18, p. 946–949. 1990.

SEMPERE, T. Phanerozoic evolution of Bolivia and adjacent regions. In *Petroleum Basins of South America*, edited by A. J. Tankard, R. S. Soruco, and H. J. Welsink, 207–230. American Association of Petroleum Geologists, Memoir 62. 1995.

SCHAEFER, S. A. Subfamily Hypoptopomatinae (armored catfishes). In *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*, edited by R. E. REIS, S. O. *Zoologia*, vol.2, p.3–86, 1989.

SUNNUCKS, P., et al. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol*. vol.9, p.1699-1710, 2000.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted). 2011.

TEMPLETON, A.R. *Population genetics and microevolutionary theory*. USA: Wiley- Liss, 2006. 705p.

UBA, C. E. et al. Evolution of the late Cenozoic Chaco foreland basin, Southern Bolivia. *Basin Research*, vol.18, p.145–170, 2006

ZANATA, A. M. *Jupiaba*, um novo gênero de Tetragonopterinae com osso pélvico em forma de espinho (Characidae, Characiformes). *Iheringia, Sér. Zool.*, n. 83, p.99-136, 1997.

WEITZMAN, S. H. A new species of *Xenobrycon* (Teleostei:Characidae) from the Río Mamoré basin of Bolivia. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, vol.100, p.112–120, 1987.

WILKINSON, M. J. et al.. River behavior on megafans and potential influences on diversification and distribution of aquatic organisms. *Journal of South American Earth Sciences*, vol.21, p.151–172, 2006.