

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**CAMILA PENHA ABREU SOUZA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MORFOMÉTRICA DE *Hoplias malabaricus* (BLOCH,  
1794) EM DRENAGENS DO ESTADO DO MARANHÃO**

São Luís  
2014

**CAMILA PENHA ABREU SOUZA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MORFOMÉTRICA DE *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) EM DRENAGENS DO ESTADO DO MARANHÃO**

Artigo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo M. Piorski

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lígia Tchaicka

CAMILA PENHA ABREU SOUZA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MORFOMÉTRICA DE *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) EM DRENAGENS DO ESTADO DO MARANHÃO**

Artigo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo M. Piorski

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lígia Tchaicka

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Nivaldo M. Piorski – UFMA/Orientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lígia Tchaicka – UEMA/Co-Orientadora

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Jorge Luiz S. Nunes - UFMA

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Elmary da Costa Fraga - UEMA

*A Deus, meu esposo e familiares.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às pessoas e entidades que colaboraram, de alguma maneira, para o desenvolvimento desse trabalho.

À Deus, pelas bênçãos maravilhosas que derramou sobre a minha vida.

À minha família que esteve ao meu lado, em especial minha mãe Gilza que acreditou em mim.

Ao meu esposo Tomáz que desde o momento que entrou em minha vida esteve ao meu lado, me apoiando e ajudando a conseguir meus objetivos. Agradeço por compreender as minhas ausências e tempo limitado para dar atenção que merece e por depositar confiança em mim, obrigada.

Ao meu orientador Prof. Dr.º Nivaldo M. Piorski pela oportunidade e confiança que depositou em mim para executar esse trabalho. Agradeço pelos ensinamentos e oportunidades.

À Prof. Dr.ª Lígia Tchaicka, pela co-orientação, por continuar a me ajudar a crescer como profissional e acreditar em mim.

Ao Prof. Dr.º Luis Fernando Carvalho Costa pela co-orientação, ensinamentos e dedicação na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr.º Jorge Luiz S. Nunes pela ajuda na realização das coletas do material.

Aos meus colegas de curso pela convivência e aprendizagem proporcionada: Adryelle, Albertina, Meriane, Pâmella, Luis Eduardo, Bruno, Ana Carolina e Gracy.

Aos professores do PPG – Biodiversidade e Conservação pela formação e pelo conhecimento transmitido.

Aos colegas de laboratório e que fazem parte do grupo GGC (Grupo de Estudo em Genética e Conservação) pelos momentos e alegrias no laboratório: Ana Paula, Carlos, Joseane, Lília Carla.

Aos professores Elmary Fraga e Claudene Barros por disponibilizar o sequenciador automático para a realização do sequenciamento das amostras.

Ao CNPq e a CAPES pelo recurso dado a essa pesquisa.

**Obrigada!!!!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	3
APRESENTAÇÃO .....	4
CAPÍTULO 1: Diversidade genética e morfométrica de <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794) em drenagens do estado do Maranhão.....	8
ANEXOS.....	31

## RESUMO

### **Diversidade genética e morfométrica de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) em drenagens do estado do Maranhão**

*Hoplias malabaricus* é um caraciforme de ampla distribuição, conhecido popularmente como traíra, que ocorre em todas as grandes bacias hidrográficas brasileiras, apresentando uma pequena diferenciação morfológica e grande variedade cariotípica. Uma vez que a população de *H. malabaricus* do estado do Maranhão apresenta apenas um citótipo reconhecido para essa região, o presente trabalho examinou sua diversidade críptica na região hidrográfica do Maranhão pelas técnicas de morfometria geométrica e diversidade molecular, associando os padrões encontrados com dados geomorfológicos e paleohidrológicos das drenagens envolvidas. Amostras de *H. malabaricus* foram coletados dos rios Turiaçu, Pindaré Mearim, Itapecuru, Munim, Gurupi, Parnaíba e Tocantins. Os dados morfométricos, obtidos a partir de 15 marcos anatômicos, foram submetidos a uma Análise das Variáveis Canônicas (AVC). Para a análise molecular foram utilizados dois marcadores, a região controle (D-Loop) do DNA mitocondrial e o gene nuclear S7 íntron 1. As análises morfométricas indicaram variações significativas entre as populações. De uma forma geral, as diferenças foram relacionadas na variação da região da cabeça e encurtamento/alongamento da região caudal. A análise molecular indicou a presença de oito Haplogrupos (A-H) para D-loop e três grupos (Grupo I, Grupo II e Grupo III) para o gene nuclear S7 íntron 1. Os resultados encontrados sugerem elevada diversidade genética em espécimes de *H. malabaricus* nas bacias hidrográficas ao longo da região norte-nordeste do Brasil com discreta variação morfométrica. Tal diversidade parece estar relacionada aos principais eventos de diversificação dos peixes de água doce, evidenciando um possível evento de especiação críptica de *H. malabaricus* em curso na região estudada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Characiformes, Traíra, Morfometria Geométrica, D-Loop,

S7int1, Filogeografia

## APRESENTAÇÃO

A Região Neotropical é caracterizada como a mais diversificada em número de espécies e densidade populacional de peixes de água doce. Entretanto, o que se conhece sobre a sistemática e os principais eventos que podem ter contribuído para a diversificação da ictiofauna é incipiente (Vari & Malabarba 1998; Reis *et al.*, 2003).

São conhecidas, aproximadamente, 5.600 espécies de peixes de água doce neotropicais, e estima-se um número de 1.550 a serem descritas. Entre os gêneros e espécies já conhecidas, muitas apresentam incertezas taxonômicas, e um grande número estão incluídos na categoria de *incertae sedis* (Reis *et al.*, 2003). As lacunas no conhecimento da ictiofauna da América do Sul são preocupantes devido ao aumento de impactos ambientais que os sistemas hidrográficos vem sofrendo.

Nesse sentido, dados moleculares têm sido cada vez mais empregados em estudos populacionais e em identificação de espécies e níveis superiores. As abordagens genéticas são ferramentas valiosas quando o uso de características morfológicas na taxonomia é dificultada por espécies, potencialmente crípticas ou de extrema variabilidade fenotípica (Albert & Reis, 2011; Lovejoy & Araújo, 2000).

Além disso, o acesso à informação genética tem impulsionado o crescimento da Filogeografia como uma disciplina distinta para o estudo da biogeografia nos níveis de espécies e população. O objetivo da Filogeografia é recuperar a história da filogenia intra-específica, normalmente através da análise da distribuição geográfica de haplótipos mitocondriais. A Filogeografia, portanto, examina os processos que afetam a estrutura genética de populações de uma espécie, incluindo os efeitos da dinâmica da paisagem, eventos de vicariância e dispersão e a perda de habitats (Avice, 2000).

Vários estudos filogeográficos têm sido usados para ajudar a estabelecer a distribuição geográfica de espécies, distinguir espécies crípticas e elucidar casos de polimorfismos intra-específicos em peixes da América do Sul (Araripe *et al.*, 2013; Borba *et al.*, 2013; Dergam *et al.*, 2002; Hubert *et al.*, 2007; Lovejoy & Araújo, 2000; Oliveira *et al.*, 2011; Ortí *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2013). Entretanto, poucos são os trabalhos sobre a ictiofauna do Estado do Maranhão.

O Maranhão está localizado em uma região de transição entre a Amazônia, o Cerrado e a Caatinga, possuindo importantes rios, tais como: Parnaíba, Itapecuru, Mearim, Pindaré, Gurupi e parte da drenagem do rio Tocantins.



Dentro desse contexto, esse estudo pretende aumentar o conhecimento sobre a filogeografia de peixes de água doce em drenagens maranhense, analisando dados genéticos e morfométricos da espécie *Hoplias malabaricus* que são apresentados no seguinte capítulo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, J. S. & R. E. Reis. 2011. Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. University of California Press, California.
- Araripe, J.; Rêgo, P. S. d; Queiroz, H.; Sampaio, I.; Schneider, H. 2013. Dispersal capacity and genetic structure of *Arapaima gigas* on different geographic scales using microsatellite markers. PLoS ONE 8(1): e54470. doi:10.1371/journal.pone.0054470.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Borba, R. S.; Zawadzki, C. H.; Oliveira, C.; Perdices, A.; Parise-Maltempi, P. P. & A. L. Alves. 2013. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. Neotropical Ichthyology, 11(1):111-116.
- Dergam, J. A.; Paiva, S. R.; Schaeffer, C. E.; Godinho, A. L. & F. Vieira. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. Genetics and Molecular Biology, 25, 4, 379-387.
- Hubert, N.; Duponchelle, F.; Nuñez, J.; Garcia-Davila, C.; Paugy, D.; & J.-F. Renno. 2007. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: Implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. Molecular Ecology 16:2115–2136.
- Lovejoy, N. R. & M. L. Araújo. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. Molecular Ecology 9:259–268.
- Oliveira, C.; Avelino, G. S.; Abe, K. T.; Mariguela, T. C.; Benine, R. C.; Ortí, G.; Vari, R. P. & R. M. Corrêa e Castro. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. BMC Evolutionary Biology, 11:275.
- Orti, G.; Sivasundar, A.; Dietz, K. & M. Jegu. 2008. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. Genetics and Molecular Biology 31:343–351.
- Pereira, T. L.; Santos, U.; Schaefer, C. E.; Souza, G. O.; Paiva, S. R.; Malabarba, L. R.; Schmidt, E. E. & J. A. Dergam. 2013. Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. Journal of Biogeography, v. 40, 905–914.
- Reis, R. E.; Kullander, S. O. & C. J. Ferraris, Jr. 2003. Check List of the Freshwater fishes of South and Central America. 212. Porto Alegre: Edipucrs.
- Vari, R. P. & L. R. Malabarba. 1998. Neotropical ichthyology: An overview. In Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (eds.), 1–11. Porto Alegre: Edipucrs.

## CAPITULO 1

Submetido para publicação na revista Journal of Fish Biology

---

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MORFOMÉTRICA DE *HOPLIAS*  
*MALABARICUS* (BLOCH, 1794) EM DRENAGENS DO ESTADO DO  
MARANHÃO**

**Diversidade genética e morfométrica de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) em drenagens do estado do Maranhão**

C. P. Abreu-Souza‡, L. Tchaicka†, L. F. Carvalho-Costa§ and N. M. Piorski‡ \*

‡*Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão – Campus São Luís, São Luís, Maranhão, Brasil. Av. dos Portugueses s/n, CEP 65085-580.*

†*Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão – Campus São Luís, São Luís, Maranhão, Brasil. Cidade Universitária Paulo VI, s/n - Tirirical, São Luís – MA Cidade Operária - CEP 65055-310.*

§*Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão – Campus São Luís, São Luís, Maranhão, Brasil. Av. dos Portugueses s/n, CEP 65085-580.*

\**Laboratório de Ecologia e Sistemática de Peixes, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão – Campus São Luís, São Luís, Maranhão, Brasil. Av. dos Portugueses s/n, CEP 65085-580.*

## RESUMO

A população de *Hoplias malabaricus* do estado do Maranhão apresenta apenas um citótipo reconhecido. Assim, este trabalho examina sua diversidade críptica na região usando técnicas de morfometria geométrica e diversidade molecular, associando os padrões encontrados com dados biogeográficos das drenagens envolvidas. Amostras de *H. malabaricus* foram coletadas nos rios Turiaçu, Pindaré, Mearim, Itapecuru, Munim, Gurupi, Parnaíba e Tocantins. Os dados morfométricos, obtidos a partir de 15 marcos anatômicos, foram submetidos a uma Análise das Variáveis Canônicas (AVC). Para a análise molecular foram utilizados dois marcadores moleculares, a região controle (D-Loop) do DNA mitocondrial e o gene nuclear *S7int1*. A análise morfométrica indicou variações significantes entre as populações. De modo geral, as diferenças foram relacionadas a variações na região da cabeça e encurtamento/alongamento da região caudal. A análise molecular indicou a ocorrência de oito Haplogrupos (A-H) para D-Loop e três clados (Grupo I, Grupo II e Grupo III) para o gene nuclear *S7int1*. Os resultados encontrados sugerem elevada diversidade genética em espécimes de *H. malabaricus* nas bacias hidrográficas do Maranhão com discreta variação morfométrica. Tal diversidade parece estar relacionada aos principais eventos de diversificação dos peixes de água doce, evidenciando um possível evento de especiação críptica de *H. malabaricus* em curso na região estudada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Characiformes, Traíra, Morfometria Geométrica, D-Loop, *S7int1*, Filogeografia

## INTRODUÇÃO

Os peixes da família Erythrinidae são caracterizados pelo corpo cilíndrico, nadadeira caudal arredondada, boca com numerosos dentes e ausência de nadadeira adiposa. Três gêneros são reconhecidos com distribuição restrita à América do Sul: *Erythrinus* (Scopoli, 1777), *Hoplerythrinus* (Gill, 1895) e *Hoplias* (Gill, 1903) (Oyakawa, 2003). *Hoplias* é o gênero com maior número de espécies e com maior distribuição dentro da família, onde se destaca a espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), conhecida popularmente como traíra.

Essa espécie ocorre em praticamente todos os rios da América do Sul, sendo considerado predador de topo de cadeia, com hábito sedentário (Oyakawa, 2003; Petry, 2005), podendo ser diferenciada de seus congêneres pela presença de dentes na superfície da língua, quatro poros no sistema látero-sensorial cefálico em cada lado do dentário, e margens inferiores dos dentários convergindo em direção à sínfise mandibular (Oyakawa, 1990). O corpo é cilíndrico, a cabeça é longa e bastante ossificada, possui boca ampla e com presença de caninos. A coloração do corpo varia de marrom escuro a bege claro, com pequenas manchas escuras e claras, dispostas de forma alternada no corpo e nas nadadeiras (Oyakawa, 2003; Santos *et al.*, 2006).

Estudos revelam grande variação morfométrica e genética entre indivíduos de populações de *H. malabaricus* de diversas bacias hidrográficas do Brasil, sugerindo um complexo de espécies, ou seja, várias espécies crípticas reconhecidas sob um único nome (Bertollo *et al.*, 1997; Bertollo *et al.*, 2000; Dergam *et al.*, 2002; Vicari *et al.*, 2005; Cioffi *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Piorski, 2010). Atualmente as populações de *H. malabaricus* são caracterizadas por apresentarem sete citótipos distintos

(A, B, C, D, E, F e G) na América do Sul, incluindo variação estrutural cromossômica e distinção do sistema sexual (Bertollo *et al.*, 2000).

A distribuição geográfica dos citótipos indica casos de simpatria e de alopatria, sendo que aqueles que não possuem sistema sexual diferenciado apresentam distribuição muito mais ampla em comparação com os outros citótipos. Os citótipos simpátricos podem ocorrer sem detecção de formas híbridas, entretanto, recentemente foi relatado o primeiro caso natural de triploidia resultando da hibridização entre espécimes do cariomorfo A e D (Bertollo *et al.*, 2000; Utsunomia *et al.*, 2014).

#### DADOS GEOMORFOLOGICOS

A abordagem filogeográfica fornece uma estrutura robusta para reconstruir aspectos centrais da biogeografia histórica dos organismos populações estudadas. O objetivo da filogeografia é recuperar a história da filogenia intraespecífica, geralmente através da análise da distribuição geográfica dos haplótipos mitocondriais. Portanto, a filogeografia examina os processos que afetam a estrutura genética de populações de uma espécie, incluindo os efeitos da dinâmica da paisagem, eventos de vicariância e dispersão e perda de habitat (Avice, 2000).

Vários estudos filogeográficos têm sido utilizados para ajudar a estabelecer a distribuição geográfica das espécies, distinguir espécies crípticas e elucidar casos de polimorfismos intra-específicas em peixes de água doce da América do Sul (Araripe *et al.*, 2013; Borba *et al.*, 2013; Dergam *et al.*, 2002; Hubert *et al.*, 2007; Lovejoy & Araújo, 2000; Oliveira *et al.*, 2011; Ortí *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2013). No entanto, há poucos estudos que descrevem os padrões geomorfológicos de bacias hidrográficas do norte e nordeste do Brasil, identificando os principais eventos que podem ter contribuído para a diversificação e distribuição da fauna de peixes atuais.

Nesta região estão importantes rios perenes que estão localizados em uma área de transição entre a floresta amazônica e o cerrado brasileiro, sendo o principal deles o rio Tocantins e Parnaíba. Alguns estudos têm indicado que esta região é uma importante área de endemismo para peixes de água doce da América do Sul, revelando a ocorrência de novas espécies (Lucena, 2007; Lundberg *et al.*, 1998; Hubert & Henno, 2006; Piorski *et al.*, 2008).

Neste contexto, devido à sua ampla distribuição e hábitos sedentários, a traíra, *H. malabaricus*, apresenta-se como um excelente modelo para estudar a diversidade de peixes de água doce da região de transição entre o norte e nordeste do Brasil. Assim, uma vez que *H. malabaricus* tende a ser considerado um complexo de espécies, o objetivo deste estudo foi examinar sua diversidade críptica em bacias hidrográficas onde ocorre um único cariomorfo, usando dados genéticos e morfométricos e associando os padrões encontrados com os dados biogeográficos disponíveis em literatura para bacias hidrográficas envolvidas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### COLETA DE AMOSTRAS

Amostras de *H. malabaricus* foram coletadas a partir das seguintes bacias hidrográficas: Tocantins, Turiaçu, Gurupi, Pindaré, Mearim, Itapecuru, Munim e Parnaíba (Tabela I, Fig. 1). Os espécimes capturados (licença de coleta SISBIO/IBAMA N. 26334-1) foram preservadas em etanol a 95% para estudos moleculares e fixados em formol a 10% para estudos morfológicos. Os espécimes foram depositados na coleção de peixes da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Estado do Maranhão, Brasil.



## MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

Para analisar as diferenças na forma e tamanho entre as amostras nós utilizamos a técnica de morfometria geométrica. Os dados morfométricos foram obtidos para 128 amostras (Tabela I) a partir de 15 marcos anatômicos fixos no lado esquerdo dos animais usando pontos homólogos (Bookstein & Strauss, 1982).

Os marcos anatômicos correspondem às seguintes estruturas: 1) ponta do focinho; 2) extremidade da maxila superior; 3) extremidade anterior da órbita; 4) extremidade posterior da órbita; 5) base da nadadeira peitoral; 6) base da nadadeira pélvica; 7) base da nadadeira anal; 8) início da nadadeira dorsal; 9) extremidade da nadadeira dorsal; 10) base do primeiro raio do lobo superior da nadadeira caudal; 11) base do último raio do lobo inferior da nadadeira caudal; 12) parte superior do crânio alinhado verticalmente com o marco 2; 13) porção inferior do crânio verticalmente alinhada com o marco 2; 14) parte superior do corpo verticalmente alinhada com o marco 5; 15) parte superior do corpo verticalmente alinhada com o marco 7 (Fig.2).

Os espécimes foram fotografados individualmente usando câmera digital, e, em seguida, as fotos foram padronizadas utilizando o programa Adobe Photoshop, com resolução de imagem de 800x600 pixels. Cada marco anatômico foi transformado em coordenadas cartesianas usando o programa tpsDig 2.15 (Rohlf, 2010). As coordenadas foram sobrepostos utilizando a Análise Generalizada de Procrustes (Rohlf & Fatia, 1990) pelo programa MorphoJ 1.02d (Klingenberg, 2008). Este método calcula uma configuração de consenso (média dos quadrados mínimos de Procrustes) com base na coordenada de referência de todos os espécimes (Bookstein, 1991), gerando uma matriz W, contendo as pontuações da deformação parcial. Foi aplicado um análise de variância (ANOVA) para testar a diferença de tamanho do centróide entre as bacias hidrográficas. Também foi

realizada a análise de variáveis canônicas (CVA) para a identificação dos grupos morfológicos. Estes testes foram realizados no programa MorphoJ 1.02d.

## EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO

Fragmentos de tecido de nadadeira / músculo de cada espécime preservado em etanol (95%) foram utilizados para a extração do DNA total seguido o procedimento dado por Sambrook et al. (1989), utilizando fenol-clorofórmio e Medrano et al. (1990) utilizando precipitação com sal.

Dois fragmentos diferentes foram amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): (I) um segmento contendo a extremidade 3' do gene tRNA<sup>PRO</sup>, que transcreve tRNA da prolina, e uma sequência parcial final 5' da região controle do DNA mitocondrial (D-loop), foi amplificado utilizando os primers DLOOP-L (Cronin *et al.*, 1993) e H16498 (Kocher *et al.*, 1989); e (II) o primeiro íntron do gene da proteína ribossomal S7 (*S7int1*), o gene da proteína ribossomal S7 codifica a maior proteína da subunidade 40S do ribossomo (Synetos *et al.*, 1992), foi amplificado utilizando os primers S7PEX1F e S7PEX2R (Chov & Hazama, 1998).

As reações de PCR foram conduzidas num volume final de 50 µL, contendo: 10-50 ng/µL de DNA total, 150 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4, e KCl 500 mM), 0.2 µM de cada primer, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.5U de Taq polimerase (Go TaqPromega) e água ultra pura para completar o volume final. As reações foram realizadas em termociclador seguido pelo programa de amplificação para a D-loop: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, 45 segundos a temperatura de anelamento dos primers [54°C, 45s, 72°C (10X); 52°C, 45s, 72°C (15X); 50°C, 45s, 72 °C (15X)] e uma extensão final a 72°C

por 4 minutos. Para a amplificação do *S7int1* as condições foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 30s desnaturação a 94°C, 35s de anelamento a 56°C, 40s de extensão a 72°C e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para cada ciclo de reações foi utilizado um controlo negativo contendo água em vez de DNA. O resultado da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo e as reações positivas foram purificadas utilizando kit de purificação em coluna (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Os purificados foram submetidos a uma segunda reação de PCR, pelo método didesoxiterminal (Sanger *et al.*, 1977), com reagentes do kit Big Dye kit (ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems, USA). As sequências de nucleotídeos foram obtidas com um sequenciador automático de DNA ABI 3500 (Applied Biosystems). As sequências foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KP400033 - KP400219 (Região Controle) e KP400220– KP400257 (*S7int1*).

## ANÁLISE DOS DADOS

As sequências foram verificados no MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis v.5) e alinhadas utilizando CLUSTALW implementado no MEGA v.5 (Tamura *et al.*, 2011). Genótipos heterozigotos nos dados do gene nuclear *S7int1* foram determinados usando PHASE 2.1.1 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly, 2003; Stephens & Scheet, 2005), que é um método estatístico Bayesiano para reconstruir haplótipos, implementando as opções padrão de 100 iterações principais, 1 intervalo de afinamento, 100 interações de burn-in, e os limites da probabilidade de confiança de 0.90.

Os dados para diversidade (número de haplótipos, diversidade de haplótipos, diversidade de nucleótidos e teste de neutralidade) foram obtidos pelo programa DnaSP (DNA Sequence Polymorphism version 5.10) (Librado & Rozas, 2009). As distâncias

genéticas entre e dentro dos haplogrupos identificados foram calculados com o MEGA v.5 utilizando distância  $p$  com variação da taxa entre os locais e distribuição de forma gamma. Uma análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada no programa ARLEQUIN v. 3.0 (Excoffier & Schneider, 2005) para verificar subdivisão populacional.

Uma análise espacial de variância molecular (SAMOVA v1.0) (Dupanloup *et al.*, 2002) foi utilizada para investigar a possibilidade de padrões alternativos de subdivisão populacional entre os locais de amostragem sobre a distribuição da variação genética no mtDNA. Uma série de análises foi realizada com  $K$  variando de 2 a 10 para criar dois a dez grupos de populações amostradas com maximizado  $F_{CT}$ . As definições da análise foram 10.000 anelamentos simulados a partir de 100 conjuntos aleatórios de condições iniciais. O nível de significância dos índices de fixação foi avaliada através de 1.000 permutações de populações entre os grupos.

Finalmente, as redes de haplótipos foram geradas com o aplicativo Hapview (Salzburger *et al.*, 2011) para estimar as relações genealógicas entre haplótipos.

## **RESULTADOS**

### **ANÁLISES MORFOMETRICAS**

A ANOVA revelou diferenças significativas no tamanho do centróide entre as populações analisadas ( $F_{5, 122} = 11,44$ ;  $p < 0,0001$ ). Os quatro primeiros eixos da análise das variáveis canônicas explicaram 92,8% da variação entre os rios e indicaram variações significativas entre as populações (distância de Mahalanobis entre 2,70 e 4,92;  $p < 0,0001$ ; Table II). O primeiro eixo, com 32,9% da variação, foi responsável pela discriminação de um grupo de indivíduos do Turiaçu e Tocantins separados do Itapecuru (Fig. 3). Neste

eixo, os espécimes são caracterizados pelo alongamento da região do focinho e da região inferior do corpo.

O segundo eixo (28,7% da variação acumulada) separou os espécimes dos rios Parnaíba e Tocantins do rio Pindaré (Fig. 3). Os espécimes do Parnaíba e Tocantins diferem dos demais pelo encurtamento de toda a região da cabeça e corpo mais alto.

O terceiro eixo (20,5% da variação acumulada) possibilitou a separação dos espécimes do rio Munim das demais populações que apresentaram valores intermediários. Nesse eixo canônico, as populações apresentam a região da cauda mais curta, a maxila em uma região mais inferior e a cabeça alta (Fig. 4). O quarto eixo (10,8% da variação acumulada) separou a população do rio Pindaré dos demais rios pelo alongamento da região caudal e superior da cabeça (Fig. 4).

## ANÁLISES MOLECULARES

Um fragmento de 442 bp (pares de base) da região controle (D-loop) foi obtido para 187 espécimes de *H. malabaricus* provenientes de 8 bacias hidrográficas analisadas. Comparações das bases de nucleotídeos mostraram 70 sítios variáveis e 59 informativos para parcimônia. Os espécimes utilizados neste trabalho descreveram 58 haplótipos, com diversidade haplotípica de 0,9657 e a diversidade nucleotídica de 0,03612. Os testes de neutralidade ( $D^*$  de Fu & Li: 0,32728,  $p > 0,10$ ;  $F^*$  de Fu & Li: 0,66361,  $p > 0,10$ ; e  $D$  de Tajima: 0,82705,  $p > 0,10$ ) não foram capazes de rejeitar a hipótese nula de neutralidade seletiva.

A região controle mostrou uma considerável estrutura populacional em espécimes de *H. malabaricus* provenientes das bacias analisadas. A SAMOVA definiu oito populações com a maior variação entre os grupos de 87,02% ( $F_{CT} = 0.87022$ ,  $p < 0.0001$ ).

Para esta estrutura genética a AMOVA demonstrou 82,49% ( $F_{CT} = 0.82492$ ,  $p < 0.0001$ ) da variação genética presente entre os grupos (Fig. 5a).

A inclusão da Rede de Haplótipos (Fig. 5b) apoiou ainda mais a divergência populacional definida pela SAMOVA, e revelou as relações genealógicas entre os oito Haplogrupos formados a partir da região controle, denominados de A-H. A maioria dos haplótipos foram exclusivos para cada bacia hidrográfica, entretanto alguns haplótipos foram compartilhados entre as bacias e outros ficaram agrupados conforme o trecho da bacia, a exemplo do Parnaíba. As bacias da região chamada "Baixada Maranhense" (Pindaré e Mearim) compartilham haplótipos entre si formando o Haplogrupo A. A Bacia do Itapecuru compartilha haplótipos com indivíduos do médio Parnaíba (localidade 15 da Fig.1 e Tabela I) denominado de Haplogrupo D. Os demais haplogrupos foram formados por indivíduos de regiões hidrográficas específicas, sendo: (i) Haplogrupo G – médio Parnaíba, (localidades 13 e 14); (ii) Haplogrupo F – baixo Parnaíba, (localidade 16); (iii) Haplogrupo E – Munim; (iv) Haplogrupo H – Tocantins; (v) Haplogrupo B - Turiaçu e (vi) Haplogrupo C – Gurupi.

As distâncias genéticas entre os Haplogrupos (distância "p") são mostradas na Tabela III, onde se observa os maiores valores de divergência genética entre os Haplogrupos D (Itapecuru+Médio Parnaíba) e G (Médio Parnaíba), E (Munim) e B (Turiaçu) (valores acima de 5,0%). Os menores valores ficaram entre os Haplogrupos A, B e C (Pindaré+Mearim, Turiaçu e Gurupi respectivamente), onde as distâncias ficaram entre 1,9% - 2,3%.

Um total de 24 espécimes de *H. malabaricus* foram seqüenciados para o gene nuclear *S7int1*, destes 14 eram heterozigotos. Obtivemos um fragmento de 655pb com 45 sítios variáveis e 28 informativos para parcimônia, gerando 38 seqüências e 17 genótipos

( $Hd = 0,9331$ ;  $Pi = 0,01317$ ). A rede de haplótipos consistiu em três grupos, de acordo com a filogenia gerada pelo mtDNA (Fig. 5c). O primeiro grupo (Grupo I) continha haplótipos provenientes dos rios Parnaíba, Itapecuru, Munim e Turiaçu, incluindo haplogrupos E, F, D, G e B, respectivamente. O Segundo grupo (Grupo II) foi composto pelos haplogrupos A e C (Pindaré+Mearim, e Gurupi). O terceiro grupo (Grupo III) foi congruente com o Haplogrupo H, o qual corresponde ao Tocantins.

## DISCUSSÃO

Diversos trabalhos de citogenética e biologia molecular têm mostrado a alta diversidade cariotípica de *H. malabaricus*, confirmando-a como um complexo de espécies (Bertollo *et al.*, 1997; Bertollo *et al.*, 2000; Dergam *et al.*, 2002; Vicari *et al.*, 2005; Cioffi *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013). Essa grande diversidade de citótipos que a espécie apresenta pode ser resultado de seu hábito sedentário e baixa intensidade de migração, induzido, assim, a formação de populações locais ou subpopulações com pouca ou nenhuma conexão e conseqüente baixo fluxo gênico, como decorrência de isolamento-por-distância (Prioli *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos neste estudo revelaram alta diversidade molecular entre os espécimes coletados nas bacias da região norte-nordeste do Brasil. A região controle identificou oito haplogrupos: (1) Pindaré + Mearim, (2) Turiaçu, (3) Gurupi, (4) Itapecuru + Médio Parnaíba, (5) Munim, (6) Baixo Parnaíba, (7) Médio Parnaíba e (8) Tocantins. Estes grupos populacionais foram claramente segregados geograficamente, e agrupados em três grupos pelo gene nuclear *S7int1*: [Tocantins], [Pindaré, Mearim e Gurupi], [Itapecuru, Parnaíba, Munim e Turiaçu]. Entretanto, a análise morfométrica revelou uma discreta

variação nos espécimes de *H. malabaricus*, associados, principalmente, a diferenças na região da cabeça e encurtamento/alongamento da região caudal. Nossos resultados indicam uma possível especiação críptica e profunda estruturação populacional nas espécies de *H. malabaricus* das bacias hidrográficas maranhenses.

Marques *et al.* (2013) encontraram valores de divergência genética entre 2,7% e 8,3% para populações do baixo rio Amazonas (caracterizadas com o citótipo C) utilizando o marcador molecular COI. Os autores apontaram que a divergência genética em nível de espécie dentro de *H. malabaricus* não é restrita a populações com citótipos distintos, podendo ocorrer com populações que apresentam o mesmo citótipo, ocorrendo o processo de especiação em *H. malabaricus* sem modificação bruta do cariótipo. O mesmo parece ocorrer com os espécimes da região norte-nordeste do Brasil que estão inseridos no citótipo F (Bertollo *et al.*, 2000) do complexo de espécies *H. malabaricus* e que apresentaram diversidade genética entre os Haplogrupos de 1,9% a 5,8% no presente estudo para a região controle do DNAm. Os maiores valores de diversidade genética foram obtidos para as bacias hidrográficas do Itapecuru, Parnaíba e Tocantins. Essas correspondem às drenagens mais extensas e antigas da região, podendo conter os haplótipos ancestrais de *H. malabaricus*.

Recentemente, Pereira *et al.* (2013) realizou um trabalho com populações de *H. malabaricus* provenientes das bacias da região leste do Brasil por meio do gene mitocondrial ATPase-6 e do gene nuclear ativador de recombinação (RAG2). Os autores encontraram quatro haplogrupos (Nordeste, Leste A, Leste B e Sudeste) com alta divergência molecular entre eles (entre 8,7% e 11,1%). Os resultados encontrados são congruentes com a unidade geomorfológica e região de endemismo da costa leste do Brasil. Também observou-se um padrão de vicariância antigo e eventos de dispersão



recentes relacionados com as ocorrências das conexões temporárias na costa causada pela variação no nível do mar. Esses dados apóiam a importância dos eventos de transgressões/regressões marinhas no processo de diversidade de peixes de água doce no Brasil relacionados com a história geomorfológica das bacias hidrográficas, que podem ter atuado nas populações estudadas no presente trabalho.

A diversificação de peixes de água doce está intimamente relacionada à história geomorfológica das bacias hidrográficas a qual vivem (Lundberg *et al.*, 1998). Hubert e Renno (2006) identificaram 11 grandes áreas de endemismos para os Characiformes neotropicais, e sugerem que a evolução das biotas de peixes de água doce da América do Sul é resultado de uma interação entre incursões marinhas, soerguimento do paleoarcos e conexões históricas que permitiram a dispersão pelas drenagens. Nessa classificação que os autores sugerem, as drenagens analisadas são divididas em três áreas de endemismos: Parnaíba, Tocantins-Xingu e Maranhão. Os nossos resultados identificaram três grupos compatíveis com essas áreas de endemismos proposto pelos autores que podem estar sofrendo processo de especiação independente relacionado à história geomorfológica das bacias hidrográficas.

Os rios Pindaré e Mearim confluem suas desembocaduras pouco antes de chegar ao “Golfão Maranhense”, constituindo, assim, um sistema hidrológico. Essas drenagens estão localizadas na “Baixada Maranhense”, formada por uma unidade geomorfológica sob influencia de estruturas neotectônicas quartenárias, associada a movimentos transgressivos e regressivos do mar (2.6 Ma) (Costa *et al.*, 1997). Sendo assim, era esperado haplótipos compartilhados entre essas duas bacias, como observado pelos dados do DNAm e S7int1.

O aplainamento da região central do Estado do Maranhão ocorrido durante o Plio-Pleistoceno (Ciclo Velhas), que produziu depressões intermontanas nos altos cursos,

também deve ter contribuído com a modelagem atual dos trechos baixos dos rios Pindaré, Mearim e Itapecuru, que se “afunilam” até o Golfão Maranhense.

A Serra do Tiracambu e suas extensões (Serras do Gurupi e da Desordem), principais divisores de águas da bacia do Gurupi, estabelecem o limite desta com as bacias do Pindaré, Turiaçu e Tocantins, sendo datadas do Mioceno - Plioceno (5.3 Ma) (Costa *et al.*, 1997). A formação da Serra do Tiracambu é compatível com o tempo de divergência do gênero *Hypostomus* entre linhagens amazônicas e maranhenses (estimado entre 5,5Ma e 5,3Ma) (Montoya-Burgos, 2003). Acreditamos que esta unidade geomorfológica pode ter funcionado como barreira entre as linhagens do Maranhão e da Amazônia e exercido um efeito vicariante entre as bacias do Gurupi, Turiaçu e Pindaré, observado na topologia do DNAmT entre os clados irmãos dos Haplogupos C, B e A (Gurupi, Turiaçu e Pindaré respectivamente).

O isolamento geográfico de drenagens pode resultar em grupos monofiléticos restritos a uma única bacia hidrográfica (Sivasundar *et al.*, 2001). Os espécimes do Tocantins apresentaram um único clado monofilético, tanto com a região controle quanto com o S7int1, corroborando com esse modelo. Esse isolamento geográfico pode ser em decorrência de duas estruturas tectônicas: Arco Tocantins e Lineamento Tocantins - Araguaia. Essas duas estruturas estão localizadas a nordeste e leste da bacia do Tocantins e são datadas do Mesozóico (Santos & Carvalho, 2004). Os arcos podem exercer papel de divisor de drenagens e formador de mosaicos de habitats, sendo considerados importantes barreiras no modelo de diferenciação alopátrica (Patton & da Silva 1998; Albert & Reis, 2011; Leite & Rogers, 2013). A associação da localização de vários arcos estruturais com a diferenciação de populações já foi descrita para várias espécies de Characiformes (Lundberg *et al.*, 1998; Hubert & Renno, 2006; Hubert *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2013).

Captura de cabeceiras ocorre quando uma parte ou todo um rio é desviado para um sistema de drenagens vizinhas em decorrência de diferentes taxas de erosão, levantamento tectônico ou de represamento por deslizamento de terra, levando a eventos de vicariância e dispersão (Albert & Reis, 2011). Esse modelo de evolução (Hipótese Hidrogeológica) prediz clados não monofiléticos para uma determinada drenagem e linhagens de uma determinada bacia hidrográfica aninhada dentro da filogenia de um clado maior localizado em uma bacia hidrográfica diferente (Lundberg *et al.*, 1998; Sivasundar *et al.*, 2001; Montoya-Burgos, 2003; Hubert & Renno, 2006; Albert & Reis, 2011). Os espécimes do médio Parnaíba formaram um grupo parafilético, para a região controle, com haplótipos compartilhados com espécimes da bacia do Itapecuru. A área onde estão as duas bacias que formam o Haplogrupo D (Itapecuru e Médio Parnaíba) são próximas e podem ter passado por um evento de captura de cabeceiras recente, retendo os haplótipos ancestrais nas duas bacias.

Os resultados encontrados sugerem uma alta diversidade genética em espécimes de *H. malabaricus* provenientes das drenagens do Maranhão e discreta variação morfométrica, indicando pelo menos quatro eventos vicariantes responsáveis pela diversidade observada: formação da Serra do Tiracambu, captura de cabeceira do rio Parnaíba pelo rio Itapecuru, aplainamento da região central do estado do Maranhão combinado com os períodos de transgressões/regressões marinhas, e isolamento geográfico por Arcos estruturais. Esse cenário parece indicar um evento de especiação em curso, com a formação possível de um complexo de espécies. Tais informações contribuem com a discussão da diversidade críptica existente em *H. malabaricus*, bem como com a delimitação de unidades para o manejo de espécies dulcícolas na região norte-nordeste do Brasil.

## Referências

- Albert, J. S. & Reis, R. E. (2011). Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. University of California Press, California.
- Barrett, J. C., B. Fry, J. Maller & M. J. Daly. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. [PubMed ID: 15297300].
- Bertollo, L. A. C., G. G. Born, J. A. Dergam, A. S. Fenocchio & O. Moreira-Filho. (2000). A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8, 603-613.
- Bertollo, L. A. C., O. Moreira-Filho & M. S. Fontes. (1997). Karyotypic diversity and distribution in *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): Cytotypes with 2n=40 chromosomes. *Brazilian Journal of Genetics*, 20, 2, 237-242.
- Blanco, D. R., L. R. Lui, L. A. C. Bertollo, D. Diniz & O. M. Filho. (2010). Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20: 1-8.
- Bookstein, F. L. (1991). Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. New York: Cambridge Univ. Press. 433p.
- Chov, S. & K. Hazama. (1998). Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology*, v.7, p. 1247-1263.
- Cioffi, M. B., C. Martins & L. A. C. Bertollo. (2009). Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics*, 10: 34.

- Costa, J. B. S., R. L. Bemerguy, Y. Hasui, M. D. S. Borges, C. R. P. F. Júnior, P. E. L. Bezerra, M. L. D. Costa & J. M. G. Fernandes. (1997). Neotectônica da região Amazônica: aspectos tectônicos, geomorfológicos e deposicionais. *Genomos*, v.4, n.2, p.23-44.
- Cronin, M. A., W. J. Spearman, R. L. Wilmot, J. C. Patton & W. B. J. (1993). Mitochondrial DNA variation in Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 50, p. 708 – 715.
- Dergam, J. A., S. R. Paiva, C. E. Schaeffer, A. L. Godinho & F. Vieira. (2002). Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 25, n.4, 379-387.
- Dupanloup, I., S. Schneider & L. Excoffier. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11, 2571–2581.
- Excoffier, L., G. Laval & S. Schneider. (2005). Arlequin, ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Hubert, N. & J. F. Renno. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, v. 33, 1414-1436.
- Hubert, N., F. D. Chelle, J. Nunes, R. Rivera, F. Bonhommes & J. F. Renno. (2007). Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. *Molecular Ecology*, 16, 2488–2503.

- Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Jacobina, U. P., P. R. A. M. Affonso, P. L. S. Carneiro & J. A. Dergam. (2009). Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 7(4):617-622.
- Klingenberg, C. P. (2008). *MorphoJ*. Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK. [http://www.flywings.org.uk/MorphoJ\\_page.htm](http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm)
- Kocher, D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca & A. C. Wilson. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, v. 86, p. 6916-6200.
- Leite, R. N. & D. S. Rogers. (2013). Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms Diversity & Evolution*, 13, 639.
- Librado, P. & J. Rozas. (2009). DnaSP v.5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Lundberg, J. G, L. G. Marshall, B. Horton, M. C. S. L. Malabarba & F. Wesselingh. (1998). The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. p 13–48.
- Marques, D. F., F. A. Santos, S. S. Silva, I. Sampaio & L. R. R. Rodrigues. (2013). Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias*

- malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. Neotropical Ichthyology, 11(2):459-466
- Medrano, J. F., E. Aesen & L. Sharrow. (1990). DNA Extraction from Nucleated Red Blood Cells. Biotechniques, v.8, p.43.
- Montoya-Burgos, J. I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. Molecular Ecology, v.12, n.7, 1855-1867.
- Oyakawa, O. T. (1990). Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo lacerdae) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Oyakawa, O. T. (2003). Family Erythrinidae. Pp. 238-240. In: Reis, R. E.; Kullander, S. O. & Ferraris Jr, C. J. (Orgs.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729p.
- Patton, J. L. & M. N. F. da Silva. (1998). Rivers, refuges, and ridges. The geography of speciation of Amazonian mammals. In D. J. Howard & S. H. Berlocher (Eds.), Endless forms: species and speciation (pp. 202–213). New York: Oxford University Press.
- Pereira, T. L., U. Santos, C. E. Schaefer, G. O. Souza, S. R. Paiva, L. R. Malabarba, E. E. Schmidt & J. A. Dergam. (2013). Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. Journal of Biogeography, v. 40, 905–914.
- Petry, A. C. (2005). A traíra *Hoplias* aff. *malabaricus* (Bloch, 1794) na planície de inundação do alto rio Paraná: influência sobre as assembleias de peixes e aspectos da auto-ecologia. Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade Estadual de Maringá. 70p.

- Piorski, N. M. (2010). Diversidade genética e filogeografia das espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustres* Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil. Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). 152 p.
- Prioli, A. J., S. M. A. P. Prioli, T. C. Maniglia, L. C. Lucio, H. F. Júlio Jr, R. Pazza, H. Carrer & L. M. Prioli. (2004). Molecular markers and genetic variability of *Hoplias aff. malabaricus* populations from the upper Paraná river floodplain.. In: Agostinho, A. A.; Rodrigues, L.; Gomes, L. C. (Org.). The Upper Parana River Floodplain: Structure and Process. Maringá: EDUEM, p. 122-126.
- Rohlf, F. J. (1990). Morphometrics. Annual Review of Ecology and Systematics, 21: 299–316.
- Rohlf, F. J. (2010). Ecology e Evolution. SUNY at Stony Brook.
- Ronquist, F. & J. P. Huelsenbeck. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19, 1572–1574.
- Rosa, R., M. Caetano-Filho, O. A. Shibatta & L. Giuliano-Caetano. (2009). Cytotaxonomy in distinct populations of *Hoplias aff. malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) from lower Paranapanema River basin. Journal of Fish Biology, 75, 2682–2694.
- Salzburger W, Ewing GB, Haeseler A. (2011). The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. Mol Ecol. 20:1952 – 1963.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. (1989). Molecular Cloning. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of



- America, 74: 5463-5467.
- Santos, G. M., E. J. G. Ferreira & J. A. S. Zuanon. (2006). Peixes comerciais de Manaus. 2ª edição. INPA , Manaus 141 p.
- Santos, M. E. C. M. & M. S. S. Carvalho. (2004). Paleontologia das Bacias do Parnaíba, Grajaú e São Luís: reconstituições paleobiológicas. CPRM-Serviço Geológico do Brasil/DIEDIG/DEPAT, Rio de Janeiro.
- Santos, U., C. M. Völcker, F. A. Belei, M. B. Cioffi, L. A. C. Bertollo, S. R. Paiva & J. A. Dergam. (2009). Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of fish Biology*, 75, 2326-2343.
- Sivasundar, A., E. Bermingham & G. Ortí. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10, 407–417.
- Stephens, M. & P. Scheet. (2005). Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *American Journal of Human Genetics* 76, 449-462.
- Stephens, M., N. J. Smith & P. Donnelly. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68, 978-989
- Strauss, R. E. & F. L. Bookstein. (1982). The truss: Body form reconstruction in morphometrics. *Syst. Zool.*, 31: 113-135.
- Synetos, D., M. D. Dabeva & J. R. Warner. (1992). The yeast ribosomal protein S7 and its genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 3008-3013.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. (2011). MEGA5:

Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.

Vicari, M. R., R. F. Artoni & L. A. C. Bertollo. (2005). Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genetics and Molecular Biology*, 28, n.1, 103-110.

Vicari, M. R., R. Pazza, R. F. Artoni, V. P. Margarido & L. A. C. Bertollo. (2006). Cytogenetics and Biogeography: Considerations about the Natural Origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçu River. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, n.2, 297-303.

## ANEXOS

**TABLE I.** Localidade das amostras de *H. malabaricus* (número da população corresponde a Fig.1), número total de indivíduos seqüenciados para cada marcador molecular, número de indivíduos utilizados na análise de morfometria geométrica e os haplogrupos identificados pela região controle e *S7int1* (números romanos entre parênteses).

<b>Bacia Hidrográfica</b>	<b>Haplogrupos (Genótipos)</b>	<b>População</b>	<b>Localidade</b>	<b>DLOOP</b>	<b><i>S7int1</i></b>	<b>Morfometria</b>
Tocantins	H (III)	1	Porto Franco (MA)	29	2	5
		2	Tucuruí (PA)			
Pindaré	A (II)	3	Buriticupu (MA)	45	3	21
		4	Pindaré-Mirim (MA)			
		5	Penalva (MA)			
Munim	E (I)	6	Chapadinha (MA)	13	6	38
Itapecuru	D (I)	7	Mirador (MA)	46	2	15
		8	Codó (MA)			
		9	Rosário (MA)			
Mearim	A (II)	10	Lago Açu (MA)	13	2	-
		11	Arari (MA)			
Turiaçu	B (I)	12	Santa Helena (MA)	10	2	29
Parnaíba	D, F, G (I)	13	Guadalupe (PI)	27	5	20
		14	São João dos Patos (MA)			
		15	Nova Iorque (MA)			
		16	Santa Quitéria (MA)			
Gurupi	C (II)	17	Centro Novo (MA)	4	2	-

**TABLE II.** Distância de Mahalanobis dos grupos de *H. malabaricus* provenientes das Bacias Hidrográficas da região norte-nordeste do Brasil. Os valores de *p* estão entre parenteses

	Itapecuru	Munim	Parnaíba	Pindaré	Tocantins
Munim	3,32 (< 0,0001)				
Parnaíba	3,88 (< 0,0001)	2,85 (< 0,0001)			
Pindaré	3,60 (< 0,0001)	2,70 (< 0,0001)	3,91 (< 0,0001)		
Tocantins	4,92 (< 0,0001)	3,81 (0,0009)	3,73 (0,0015)	4,34 (< 0,0001)	
Turiaçu	3,93 (< 0,0001)	3,10 (< 0,0001)	3,46 (< 0,0001)	2,81 (< 0,0001)	3,44 (0,0019)

**TABLE III.** Divergência genética (distância-p) usando sequências da região controle (D-loop) entre os Haplogrupos de *H. malabaricus* da região norte-nordeste do Brasil. Valores abaixo da diagonal representam a distância entre os haplogrupos. Valores na diagonal representam as distâncias dentro dos haplogrupos.

	HapGp A	HapGp B	HapGp C	HapGp D	HapGp E	HapGp F	HapGp G	HapGp H
HapGp A	<b>0,006</b>							
HapGp B	0,022	<b>0,001</b>						
HapGp C	0,023	0,019	<b>0,005</b>					
HapGp D	0,044	0,050	0,039	<b>0,004</b>				
HapGp E	0,040	0,037	0,039	0,051	<b>0,003</b>			
HapGp F	0,048	0,049	0,039	0,046	0,033	<b>0,013</b>		
HapGp G	0,048	0,043	0,039	0,058	0,040	0,039	<b>0,006</b>	
HapGp H	0,045	0,045	0,040	0,049	0,043	0,047	0,043	<b>0,005</b>

### Lista de legenda de figuras

**Fig.1** Locais de amostragem de *H. malabaricus* da região norte-nordeste do Brasil. Os números correspondem aos nomes das localidades da Tabela I e as cores correspondem as bacias hidrográficas: ▲, Tocantins; ▲, Gurupi; ▲, Turiaçu; ▲, Pindaré; ▲, Mearim; ▲, Itapecuru; ▲, Munim; ▲, Parnaíba.

**Fig.2** Esquema dos 15 marcos anatômicos projetados em regiões homólogas da superfície lateral esquerdo de *H. malabaricus*. Ver texto para detalhes. Foto: NMP

**Fig.3** Projeção dos escores individuais de seis populações de *H. Malabaricus* no espaço dos primeiro e segundo eixos canônicos e as deformações (linha azul escuro) de cada eixo canônico em relação a configuração de referencia (linha azul claro). As cores correspondem as bacias hidrográficas: ▲, Tocantins; ▲, Turiaçu; ▲, Pindaré; ▲, Munim; ▲, Itapecuru; ▲, Parnaíba.

**Fig.4** Projeção dos escores individuais de seis populações de *H. Malabaricus* no espaço do terceiro e quarto eixos canônicos e as deformações (linha azul escuro) de cada eixo canônico em relação a configuração de referencia (linha azul claro). As cores correspondem as bacias hidrográficas: ▲, Tocantins; ▲, Turiaçu; ▲, Pindaré; ▲, Munim; ▲, Itapecuru; ▲, Parnaíba.

**Fig.5** (a) Mapa mostrando a distribuição geográfica das populações definidas pela SAMOVA. As letras correspondem aos Haplogrupos das sequências mitocondriais. (b) Rede Haplótica gerada usando um fragmento da Região Controle do mtDNA de *H. malabaricus*. Os círculos têm tamanho proporcional à frequência dos haplótipos e as cores correspondem as Bacias Hidrográficas mostradas na legenda da Fig. 1. As letras correspondem aos oitos Haplogrupos definidos pela SAMOVA. (c) Rede de haplótipos gerada usando sequências *S7int1* de *H. malabaricus*. Os círculos têm tamanho proporcional à frequência dos haplótipos e as cores correspondem as Bacias Hidrográficas mostrados na legenda da Fig. 1. Os números romanos representam os grupos definidos para o gene nuclear.





