

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

THAÍS SOUTO BIGNOTTO

Comparação molecular de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Characiformes, Serrasalmidae) das bacias do alto rio Paraná, alto rio Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
AGOSTO – 2010

THAÍS SOUTO BIGNOTTO

Comparação molecular de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Characiformes, Serrasalminidae) das bacias do alto rio Paraná, alto rio Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
AGOSTO - 2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B593c Bignotto, Thais Souto
Comparação molecular de piranhas dos gêneros
Serrasalmus e *Pygocentrus* (Characiformes,
Serrasalminidae) das bacias do alto rio Paraná, alto
rio Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco /
Thais Souto Bignotto. -- Maringá, 2010.
xii, 172 f. : il. col., figs., quadros

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Alves
Pinto Prioli.

Co-orientador: Horácio Ferreira Júlio Júnior.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, 2010.

1. Piranha (*Serrasalmus* e *Pygocentrus*) - Complexo
de espécies - Alto rio Paraná, alto rio Paraguai,
rio Tocantins e rio São Francisco. 2. Diferenciação
molecular. 3. Marcadores mitocondriais - D-loop,
citocromo c oxidase I e citocromo b. I. Prioli,
Alberto José, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento. III. Título.

CDD 21.ed. 597.48

AMMA-00045

Aos meus pais, José Elias Bignotto e Janete Souto Silva Bignotto. Obrigada pelo amor, educação, apoio e confiança que sempre depositaram em mim.

Ao meu irmão, Lucas Souto Bignotto, pela compreensão e paciência.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para superar todas as dificuldades.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade deste trabalho se tornar realidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida.

Ao meu Orientador, professor doutor Alberto José Prioli, e à minha Coorientadora, professora doutora Sônia Maria Alves Pinto Prioli, pelos ensinamentos, dedicação e confiança depositada em mim e pela amizade durante quase dez anos de convivência.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, por contribuírem diretamente com minha formação profissional.

Ao Secretário do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz, pela disposição com que sempre me atendeu.

Ao Nupélia, pelo apoio irrestrito.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/ Programa Ecológico de Longa Duração (CNPq/ PELD).

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética e do Nupélia (Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura), especialmente à Maria José e ao Donizete, pela dedicação, amizade e pelo auxílio na parte técnica.

À professora doutora Maria Aparecida Fernandez e equipe de laboratório, pela ajuda com as reações de seqüenciamentos.

Ao Dr. Edson Kiyoshi Okada, da Universidade Estadual de Maringá, pela coleta dos exemplares de piranhas no rio Manso.

Ao professor doutor Carlos Sérgio Agostinho, da Universidade Estadual de Tocantins, pelas amostras de piranhas coletadas na bacia do rio Tocantins.

Ao Dr. Daniel Cardoso de Carvalho, da Universidade Federal de Minas Gerais, pelos espécimes de piranhas coletados na bacia do rio São Francisco.

Ao Alessandro Gasparetto Bifi, pelo auxílio com as fotos dos exemplares de piranhas das bacias do alto rio Paraná e do alto rio Paraguai.

Aos amigos do Laboratório de Genética, em especial, Thiago Cintra Maniglia, Vivian Nunes Gomes, Talge Aiex Boni, Rodrigo de Mello, Boris Briñez, Sílvia Machado e Léia Carolina Lúcio, pelo indispensável apoio em importantes etapas deste trabalho. Obrigada pelo companheirismo, amizade e consideração de cada um durante tantos anos.

À minha família, meu alicerce, por todo apoio e incentivo. Em especial, aos meus pais, Janete Souto Silva Bignotto e José Elias Bignotto, pela educação, amor e compreensão pelas ausências durante o desenvolvimento deste trabalho, e ao meu irmão, Lucas Souto Bignotto, por toda amizade, amor e paciência.

Ao meu namorado e amigo, Fabiano Aparecido Rios, pelo amor, compreensão, paciência e apoio durante esse período.

Aos meus verdadeiros amigos, em especial, Graciene de Souza Bido, pela ajuda, incentivo e por sempre acreditar em mim.

E a tantos outros que sempre me acompanharam nessa trajetória, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Thaís Souto Bignotto, filha de José Elias Bignotto e Janete Souto Silva Bignotto, nasceu aos vinte e nove dias do mês de julho de 1982, na cidade de Assis, estado de São Paulo.

Iniciou o Ensino Fundamental, em 1993, no Colégio Estadual Dr. João Mendes Jr., concluindo-o no Colégio Diocesano Santo Antônio, em 1996, na cidade de Assis-SP. Ainda no Colégio Diocesano Santo Antônio, em 1999, concluiu o Ensino Médio.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, em 2001, graduando-se em Licenciatura Plena e Bacharelado, no ano letivo de 2004.

Em 2006, concluiu o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, da Universidade Estadual de Maringá.

No mesmo ano, pela modalidade mudança de nível, iniciou o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da mesma Instituição de Ensino.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Considerações gerais.....	5
2.1.1. Ordem Characiformes	5
2.1.2. Família Serrasalmidæ.....	8
2.1.3. Piranhas	15
2.1.3.1. Estudos moleculares e citogenéticos em piranhas.....	18
2.2. Ictiofauna de água doce e a relação das bacias hidrográficas do Paraná-Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco	28
2.3. Marcadores moleculares em estudo de populações naturais de peixes	29
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO I Evidências genéticas para um complexo de espécies em <i>Serrasalmus maculatus</i> (Characiformes, Serrasalmidæ) das bacias hidrográficas Paraná-Paraguai e Tocantins	48
RESUMO.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. Material biológico.....	52
2.2. Áreas de estudo	54
2.2.1. Planície de inundação do alto rio Paraná	54
2.2.2. Bacia do alto rio Paraguai	55
2.2.3. Bacia hidrográfica Araguaia-Tocantins	56
2.3. Extração do DNA genômico	56
2.4. DNA mitocondrial e amplificação via PCR	57
2.5. Sequenciamento	58
2.6. Verificação de saturação	59
2.7. Análises filogenéticas	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1. Região controle do DNA mitocondrial (<i>D-loop</i>).....	62
3.2. Gene mitocondrial citocromo b (<i>Cytb</i>)	70
3.3. Gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (<i>CoxI</i>)	77
3.4. Considerações gerais.....	84
4. CONCLUSÕES	90
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
CAPÍTULO II Relações genéticas e filogenéticas de piranhas dos gêneros <i>Serrasalmus</i> e <i>Pygocentrus</i> (Characiformes, Serrasalmidæ) baseadas em marcadores moleculares mitocondriais.....	98

RESUMO.....	98
1. INTRODUÇÃO.....	100
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	103
2.1. Material biológico.....	103
2.2. Áreas de estudo.....	104
2.2.1. Planície de inundação do alto rio Paraná.....	104
2.2.2. Rio Manso.....	105
2.2.3. Bacia do rio Tocantins.....	105
2.2.4. Bacia do rio São Francisco.....	105
2.3. Extração de DNA genômico.....	106
2.4. DNA mitocondrial e amplificação via PCR.....	106
2.5. Sequenciamento.....	108
2.6. Verificação de saturação.....	108
2.7. Análises filogenéticas.....	109
2.8. Sequências do <i>GenBank</i>	110
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112
3.1. Citocromo b (<i>Cytb</i>).....	112
3.1.1. Padrão de variação da sequência nucleotídica.....	112
3.1.2. Polimorfismo aminoacídico.....	116
3.1.3. Análises filogenéticas.....	117
3.2. Citocromo c oxidase subunidade I (<i>CoxI</i>).....	126
3.2.1. Padrão de variação da sequência nucleotídica.....	126
3.2.2. Polimorfismo aminoacídico.....	130
3.2.3. Análises filogenéticas.....	130
3.3. Considerações sobre as hipóteses filogenéticas.....	140
3.3.1. Delimitação de espécies de piranhas.....	141
3.3.1.1. DNA <i>barcode</i>	142
3.3.1.2. <i>Pygocentrus nattereri</i> e <i>Pygocentrus piraya</i>	143
3.3.1.3. <i>Serrasalmus maculatus</i> e <i>Serrasalmus</i> sp.	144
3.3.1.4. <i>Serrasalmus rhombeus</i> e <i>Serrasalmus marginatus</i>	146
3.3.1.5. <i>Serrasalmus brandtii</i>	147
3.4. Relações entre as bacias hidrográficas.....	147
4. CONCLUSÕES.....	152
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	153
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154
ANEXO 1.....	163
ANEXO 2.....	165
ANEXO 3.....	167

RESUMO

BIGNOTTO, Thaís Souto. D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, agosto de 2010. **Comparação molecular de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Characiformes, Serrasalmidae) das bacias do alto rio Paraná, alto rio Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco.** Professor Orientador: Alberto José Prioli. Professores Conselheiros: Sônia Maria Alves Pinto Prioli e Horácio Ferreira Júlio Júnior.

Peixes conhecidos popularmente como “piranhas” pertencem à família Serrasalmidae, ordem Characiformes, e englobam os gêneros *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Pygopristis*. Diversos estudos filogenéticos e de sistemática têm sido desenvolvidos com esse grupo de peixes, mas muito ainda permanece sem esclarecimento. A condição monofilética de *Serrasalmus* tem sido questionada e as relações entre os táxons da família ainda não foram estabelecidas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente diferentes espécies de piranhas (*Serrasalmus maculatus*, *S. marginatus*, *S. eigenmanni*, *S. rhombeus*, *S. brandtti*, *Serrasalmus* sp., *Pygocentrus nattereri* e *P. piraya*) das bacias do alto rio Paraná, alto rio Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco, no intuito de contribuir na compreensão das relações genéticas e filogenéticas do grupo. Segmentos do DNA mitocondrial – região controle (*D-loop*) e os genes citocromo b e citocromo c oxidase I – foram seqüenciados e analisados. Foram realizadas análises filogenéticas de máxima verossimilhança, *neighbor-joining* e de inferência bayesiana. As espécies de piranhas que ocorrem em mais de uma bacia hidrográfica estão geneticamente diferenciadas entre si, de acordo com suas respectivas localidades. As populações de *Pygocentrus nattereri* das bacias do rio Tocantins e do alto rio Paraguai são, indubitavelmente, distintas uma da outra. O mesmo acontece com as populações de *Serrasalmus maculatus* da bacia do rio Tocantins e do sistema Paraná-Paraguai. As populações de *P. nattereri* foram diferenciadas por baixos valores de distância genética, caracterizando diferenças entre populações de uma única espécie amplamente distribuída. Em contraste, as populações de *S. maculatus* apresentaram valores de divergência genética comumente encontrados entre espécies diferentes, indicando que, possivelmente, há um complexo de pelo menos duas espécies de *S. maculatus* nos locais estudados. Houve compartilhamento

de haplótipos mitocondriais entre *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus*, ambas da bacia do rio Tocantins, sugerindo que estas pertencem à uma única espécie ou que eventos de hibridação ocorrem na região. *Serrasalmus marginatus* e *S. rhombeus* revelaram-se muito próximos entre si, com baixos valores de distância genética. Além disso, *S. rhombeus* foi dividido em dois clados menores por valores equivalentes ao detectado entre essa espécie e *S. marginatus*, o que sugere a provável existência de um complexo de espécies. O padrão biogeográfico encontrado para as espécies de piranhas analisadas parece estar de acordo com os eventos geológicos e hidrológicos anteriormente documentados em literatura. A separação das bacias hidrográficas e eventos de captura de cabeceira entre diferentes sistemas fluviais que ocorreram no passado parecem ter influenciado fortemente a distribuição das espécies de piranhas.

Palavras-chave: complexo de espécies; diferenciação molecular; marcadores mitocondriais.

ABSTRACT

BIGNOTTO, Thaís Souto. D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, August, 2010. **Molecular comparison of the piranhas genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus* (Characiformes, Serrasalmidae) from upper Paraná, upper Paraguai, Tocantins and São Francisco River basins.** Adviser professor: Alberto José Prioli. Committee members: Sônia Maria Alves Pinto Prioli and Horácio Ferreira Júlio Júnior.

Fish known as “piranhas” belong to the family Serrasalmidae, order Characiformes, and comprise four genus (*Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* and *Pygopristis*). Several phylogenetic and systematic studies that include this group of fish have been developed, although much remains unclear. The monophyletic condition of *Serrasalmus* was not successfully accomplished and relationships among Serrasalmidae taxons were not yet established. Hence, this work aims to characterize different piranhas species (*Serrasalmus maculatus*, *S. marginatus*, *S. eigenmanni*, *S. rhombeus*, *S. brandtii*, *Serrasalmus* sp., *Pygocentrus nattereri* and *P. piraya*) from Upper Paraná River, Upper Paraguai River, Tocantins River and São Francisco River basins in an attempt to contribute with the comprehension of their genetic and phylogenetic relationships. DNA mitochondrial regions – control region (D-loop) and cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes – were sequenced and analysed. Phylogenetic analysis of neighbor-joining, maximum-likelihood and Bayesian approach were performed. Piranhas species inhabiting more than one hydrographic basin are genetically differentiated according to their respective localities. *Pygocentrus nattereri* populations from Tocantins and upper Paraguai River basins are genetically different from each other. The same occurred to *Serrasalmus maculatus* populations from Tocantins and Paraná-Paraguai River basins. *Pygocentrus nattereri* population from Tocantins River differed from upper Paraguai River population by low values of genetic distance, which characterizes differences between populations of only one species that is broadly distributed. On the other hand, *S. maculatus* populations presented values of divergence usually found for different species. This can suggest that there is a *S. maculatus* complex of at least two species on the localities sampled. Shared mitochondrial haplotypes were identified between *Serrasalmus* sp. and *S. maculatus* both from Tocantins River basin, indicating that or these fish belong to one

same species or hybridization processes occur frequently in this basin. Low values of genetic distances were identified between *S. marginatus* and *S. rhombeus*, indicating that these species are very close to each other. Moreover, *S. rhombeus* was split into two clades by values very similar to those found between *S. rhombeus* and *S. marginatus*. This also suggests the occurrence of a species complex. The biogeographic pattern found for the analyzed piranhas species seems to corroborate the geological and hydrological events previously documented in the literature. Basins separations and headwater capture events between different rivers systems that occurred in the past seem to have strongly influenced the distribution of piranha species.

Key words: species complex; molecular differentiation; mitochondrial markers.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Peixes conhecidos popularmente como “piranhas” ou “piranhas verdadeiras” incluem, tradicionalmente, apenas quatro gêneros: *Serrasalmus* (com 28 espécies), *Pygocentrus* (três ou quatro), *Pristobrycon* (cinco) e *Pygopristis* (uma) (Jégu, 2003; Freeman et al., 2007). São peixes de água doce, neotropicais pertencentes à família Serrasalminidae, a qual compreende, além das piranhas, pacus e tambaquis. A distribuição natural desse grupo abrange toda a América do Sul, incluindo rios das bacias Amazônica, do Orinoco, das Guianas, Araguaia-Tocantins, Paraná-Paraguai e do São Francisco (Jégu, 2003).

Piranhas são amplamente reconhecidas pela formidável dentição e hábitos carnívoros. Todas as espécies possuem uma única fileira de dentes em ambas as maxilas, os dentes são afiados, com cúspides e utilizados principalmente para perfurar e rasgar. Em virtude da sua voracidade e do hábito carnívoro, histórias sobre piranhas, principalmente dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, associadas a ataques a outros animais, ou até mesmo a pessoas, são encontradas em diversos livros de história natural, mas existem poucos dados científicos apoiando este comportamento. Ocasionalmente, esses peixes atacam banhistas em lagos e rios, mas o perfil da maioria das injúrias é uma única mordida por vítima, e normalmente, está relacionada à defesa da prole (Haddad e Sazima, 2003). De acordo com Agostinho (2003), *S. marginatus* pode ser agressiva e atacar banhistas para defender sua prole ou território. Frequentemente, são relacionadas a nadarem em cardumes de centenas de indivíduos, nunca atacando sozinhas e mordendo qualquer coisa que se mova (Myers, 1972). Braga (1975) relata vários casos de ataques de piranhas a seres humanos. Entretanto, Goulding (1980) reduz a maioria dos contos sobre piranhas que atacam pessoas para uma proporção mais realista.

Ecologicamente, as piranhas são importantes componentes de seus habitats, desempenhando funções benéficas no ambiente em que vivem. Por atacarem preferencialmente peixes doentes ou feridos, as piranhas atuam no processo de seleção natural e na manutenção de equilíbrio do ecossistema aquático (Schulte, 1988). Segundo Sazima e Machado (1990), esses peixes têm grande influência na distribuição

local e na composição da assembléia de peixes, afetando o uso do habitat, comportamento de outros peixes, estrutura social e modo de alimentação da comunidade de peixes.

Piranhas são animais de relativo valor comercial nas bacias hidrográficas em que ocorrem, apesar de serem menos valorizadas do que outros serrasalmídeos. Frequentemente, são consumidas por pescadores que realizam pesca de subsistência e ainda podem ser vendidas em mercados locais. *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, principalmente, são utilizados como peixes de aquário ou vendidos como *souvenir* para turistas como espécimes secas (Freeman et al., 2007). De acordo com Agostinho et al. (1997), piranhas são consideradas um obstáculo para a pesca comercial e esportiva, pois elas roubam iscas, mutilam presas, destroem redes de pesca e podem morder quando manuseadas.

Apesar de sua importância, a taxonomia e sistemática atual de piranhas são complicadas e relativamente pouco conhecidas. As relações evolutivas entre piranhas têm sido objetos de estudos de vários pesquisadores que atuam nas mais diversas áreas, empregando-se para essa finalidade caracteres morfológicos (Machado-Allison, 1983), citológicos (Nakayama et al., 2008), parasitológicos (Van Every e Kritsky, 1992) e moleculares (Ortí et al., 1996; Freeman et al., 2007). Contudo, muito ainda permanece questionável. Dados morfológicos e moleculares têm sido utilizados na tentativa de testar a monofilia do grupo. Do mesmo modo, dados cromossômicos têm revelado características citotaxonômicas úteis e gerado informações sobre as relações taxonômicas das espécies de piranhas (Nakayama et al., 2008).

A classificação proposta por Machado-Allison (1983), baseada em caracteres apomórficos, é amplamente aceita por pesquisadores e considera o grupo como uma unidade monofilética dentro da subfamília Serrasalminae. Porém, mais recentemente, há consenso sobre o posicionamento desse grupo em uma família separada (família Serrasalmidae; e.g., Calcagnotto et al., 2005, Freeman et al., 2007; Ortí et al., 2008; Mirande, 2009). Estudos morfológicos e moleculares concordam com a hipótese de que os gêneros de piranhas *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus*, juntamente com *Catoprion*, constituem uma unidade monofilética da família Serrasalmidae. Entretanto, as relações internas do grupo ainda não estão bem

estabelecidas. Sugere-se que pelo menos dois gêneros, *Serrasalmus* e *Pristobrycon*, não sejam monofiléticos (Ortí et al., 1996, 2008; Freeman et al., 2007).

Marcadores moleculares baseados em DNA representam valiosa ferramenta em estudos de diversidade e estruturação genética, de análises filogenéticas e do processo evolutivo em diversos grupos taxonômicos. O polimorfismo do DNA é resultante de isolamento geográfico e reprodutivo, seleção, mutação e recombinação e revela o caminho evolutivo de várias espécies, estabelece níveis de parentesco e traça estruturas genéticas características de cada grupo.

Várias regiões do DNA mitocondrial (mtDNA) são utilizadas para estudos genéticos de populações naturais, sendo informativas em comparações intra e interespecíficas. A molécula do mtDNA provou ser um eficiente marcador para estudos de evolução animal, assim como de filogeografia, filogenia e genética populacional. Devido ao mtDNA ser predominantemente materno, apresentar regiões com elevada taxa de substituição de bases, pouca recombinação e ser de fácil isolamento (Awise, 2004), vários segmentos são utilizados em estudos genéticos. Entre os marcadores moleculares mitocondriais, o citocromo b (*cytb*) é um dos genes mais extensivamente sequenciados em vertebrados, além de ser relativamente bem conhecido com relação à dinâmica evolutiva do gene e estrutura e função de seu produto protéico (Esposti et al., 1993). O gene citocromo b é comumente usado na construção de relações filogenéticas tanto em níveis intra ou interespecíficos (e.g., Lima et al., 2005; Drew et al., 2010) como em níveis mais elevados filogeneticamente (e.g., Hardman e Lundberg, 2007).

Mais recentemente, sequências nucleotídicas referentes ao gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (*coxI*, ~650 pares de base), denominadas “DNA barcode” (“código-de-barras”), têm sido propostas como uma ferramenta padrão para identificação de animais em nível de espécie (Hebert et al., 2003). Por compreender um sistema de identificação baseado apenas em DNA, essa metodologia ainda permanece bastante controversa (Moritz e Cicero, 2004; Fitzhugh, 2006; Ebach e Carvalho, 2010), mas demonstrou ser eficiente na distinção de diversas espécies de animais (Hebert et al., 2004; Lorenz et al., 2005; Ward et al., 2005, 2007; Birky Jr., 2007; Rach et al., 2008).

Ambos os genes citocromo b e citocromo c oxidase subunidade I, por serem codificantes, apresentam taxa de mutação relativamente baixa. A região controle hipervariável do genoma mitocondrial (*D-loop*), ao contrário, é um segmento em que mutações acumulam-se mais rapidamente e, por isso, o *D-loop* tem sido a sequência de escolha para estudos taxonômicos e genéticos de populações e espécies próximas, inclusive de peixes (Sivasundar et al., 2001; Avise, 2004; Oliveira et al., 2006). O *D-loop* possui aproximadamente 0,8 kb e é responsável pelo controle da replicação do mtDNA e transcrição do RNA (Avise et al., 1987, Park e Moran, 1994).

A caracterização genética de comunidades aquáticas é útil para revelar diferenças genéticas intra e interespecíficas, produzindo informações relevantes sobre biodiversidade e história evolutiva das populações. Deste modo, este trabalho pretende contribuir na caracterização e esclarecimento das relações evolutivas entre espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Assim, nos capítulos seguintes, são apresentados os resultados de estudos moleculares do genoma mitocondrial de populações naturais de piranhas coletadas nas bacias hidrográficas do alto rio Paraná, alto rio Paraguai, rio São Francisco e rio Tocantins.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais

Os peixes constituem mais da metade do número total de vertebrados, com um número estimado de quase 28.000 espécies válidas, representando uma enorme diversidade morfológica e de habitats ocupados. Esta diversidade é, em parte, responsável pela dificuldade na compreensão de sua história evolutiva e no estabelecimento de classificações (Nelson, 2006).

A ictiofauna neotropical de água doce é um componente extremamente rico da ictiofauna mundial, sugerindo que das 13.000 espécies de peixes de água doce, ela compreenda aproximadamente 6.000 espécies, sendo que cerca de 1.550 ainda não foram descritas (Reis et al., 2003). No Brasil, a ictiofauna pode ser dividida em seis grupos principais: Characiformes (e.g., piranhas, lambaris, dourados, etc.), Siluriformes (cascudos, surubim, jaú, bagres, etc.), Cichlidae (acarás, tucunarés, etc.), Cyprinodontiformes (barrigudinhos, guarus, etc.), invasores marinhos (raias, pescadas, linguados, etc.) e relitos (pirambóia, pirarucu, peixe folha, aruanã) (Bizerril e Primo, 2001).

2.1.1. Ordem Characiformes

Weitzman (1962) descreve os caraciformes como “um caso extremo de adaptação e radiação evolutiva”. Peixes desta ordem fornecem um exemplo dos complexos padrões evolutivos e biogeográficos geralmente vistos nas faunas tropicais e subtropicais. Os caraciformes constituem um grupo diverso morfológica e ecologicamente que habitam os rios e lagos da África, América Central e do Sul e sul da América do Norte. A especialização trófica encontrada nesses animais é vasta e inclui detritívoros, herbívoros, planctívoros e carnívoros. Algumas espécies têm adaptações morfológicas e fisiológicas peculiares para sobrevivência em condições extremas de baixa concentração de oxigênio, condições estas geralmente encontradas em ambientes como planícies de inundação (Ortí e Meyer, 1997).

Os caraciformes são caracterizados morfológicamente pela presença de nadadeira pélvica com 5-12 raios, nadadeira anal de curta a moderadamente longa

(menos de 45 raios) e, geralmente, apresentam nadadeira adiposa. A maioria das espécies apresenta dentes desenvolvidos. O corpo é coberto por escamas, na maioria das vezes do tipo ciclóide, linha lateral frequentemente encurvada e algumas vezes incompleta e os barbilhões estão sempre ausentes. A variação de tamanho entre os caraciformes é notável, podendo alcançar até 1,4 m em *Hydrocynus goliath*, enquanto as menores espécies compreendem adultos que não excedem a 13 mm de comprimento (Nelson, 2006). Apenas alguns grupos exibem cuidado parental (Ortí e Meyer, 1997).

Dezoito famílias com cerca de 270 gêneros e, pelo menos, 1.674 espécies compõem a ordem Characiformes (Nelson, 2006). A maior diversidade é encontrada na região Neotropical (14 famílias e aproximadamente 1.460 espécies, contra apenas quatro famílias e 208 espécies no continente africano), onde dominam os sistemas de água doce das planícies (Winemiller, 1996). A exclusividade a ambientes aquáticos continentais confere aos caraciformes uma estreita ligação aos processos dinâmicos da história geológica, permitindo sua utilização como grupo modelo em estudos biogeográficos (Myers, 1938; Calcagnotto et al., 2005). Uma relevante questão na biogeografia dos caraciformes envolve a consequência evolutiva dos eventos vicariantes, causados pela separação dos continentes africano e sul-americano (Ortí e Meyer, 1997).

A origem da maioria das linhagens (famílias) de peixes caraciformes data de mais de 100 milhões de anos atrás, quando África e América do Sul ainda formavam um único continente, Gondwana (Lundberg, 1993; Ortí e Meyer, 1997; Calcagnotto et al., 2005). Esta inferência tem sido baseada em evidências indiretas, como análises filogenéticas e distribuição geográfica das famílias de caraciformes. Uma hipótese alternativa sugere que as espécies atuais teriam se originado de formas ancestrais comuns independentemente em cada um dos continentes, após a separação da África e América do Sul com a abertura da parte sul do oceano Atlântico (85-110 milhões de anos atrás). Entretanto, não há atualmente evidências disponíveis consistentes com esse cenário. Para isso, seria necessário assumir que as famílias africanas e neotropicais teriam, cada uma, origens monofiléticas distintas. Contudo, estudos filogenéticos baseados em caracteres morfológicos (Ortí e Vari, 1999) e moleculares (Ortí e Meyer, 1997; Calcagnotto et al., 2005) demonstraram que as famílias africanas

estão dispersas entre as neotropicais, em vez de formarem uma única unidade monofilética (Ortí e Vari, 1999).

Como táxons africanos e neotropicais não formam grupos monofiléticos distintos, tem sido sugerido que a origem da maioria dos clados de caraciformes precedeu à divisão continental, há aproximadamente 100 milhões de anos atrás (Greenwood, 1984; Meyer et al., 1990; Meyer, 1993). Como consequência, a presente distribuição dos caraciformes pode ser explicada ou por eventos de extinção desigual dos táxons africanos (pelo menos seis linhagens teriam sido extintas, segundo Ortí e Meyer, 1997), ou pela possibilidade de dispersão marinha (Lundberg, 1993; Ortí e Meyer, 1997; Calcagnotto et al., 2005). Apesar de, atualmente, todos os peixes caraciformes serem exclusivos de água doce, Calcagnotto et al. (2005) sugerem que a dispersão marinha pode ter ocorrido no início da história dos caraciformes, uma vez que alguns táxons da série *Otophysi* ocupavam ambientes salinos.

Atualmente, é amplamente aceito o fato de que a separação da África e América do Sul não pode ser considerada como um único evento, mas sim como uma série de eventos que duraram mais de 100 milhões de anos, possibilitando a ocorrência de múltiplos eventos de vicariância e de dispersão (Lundberg et al., 1998; Maisey 2000; Calcagnotto et al., 2005). A deriva dos continentes determinou, ainda, o soerguimento da cordilheira dos Andes, permitindo a formação da bacia Amazônica, o que ofereceu as melhores oportunidades para os caraciformes. Este fato pode também explicar o maior número de espécies presente nos Neotrópicos, quando comparado à África (Géry, 1977).

Relações filogenéticas entre as famílias de caraciformes são controversas (e.g., Buckup, 1991; Lucena, 1993; Uj, 1990; Vari, 1995) e frequentemente estão baseadas apenas em caracteres morfológicos. Estudos mais recentes utilizaram seqüências mitocondriais e/ou nucleares para avaliar e comparar hipóteses filogenéticas (Ortí e Meyer, 1997; Calcagnotto et al., 2005), demonstrando serem congruentes com alguns resultados obtidos por meio de dados morfológicos. Por exemplo, ambos dados morfológicos e moleculares concordam na existência de três ocasiões em que há relação de grupos irmãos africanos e sul americanos entre os peixes caraciformes (Buckup, 1991; Lucena, 1993; Ortí e Meyer, 1997; Calcagnotto et al., 2005). O

primeiro grupo com relações trans-continentais envolve a unidade monofilética formada pelas famílias africanas Citharinidae e Distichodontidae, que é irmã de todos os outros caraciformes, enquanto o segundo é compreendido pelas famílias africanas Hepsetidae e neotropical Erythrinidae. O último grupo envolve a família africana Alestidae (Ortí e Meyer, 1997; Calcagnotto et al., 2005).

2.1.2. Família Serrasalmidae

Serrasalmídeos estão alocados na ordem Characiformes e compreendem peixes popularmente conhecidos como piranhas, pacus e tambaquis. Apresentam distribuição estritamente Neotropical, de maneira que sua presença em qualquer outro local é resultado de processos de introdução. No Brasil, a bacia do rio Amazonas abriga todos os gêneros de serrasalmídeos, e apenas seis ocorrem na bacia Paraná-Paraguai e três na bacia do rio São Francisco (Jégu, 2003). Além da grande distribuição geográfica, os serrasalmídeos ocupam uma extensa diversidade de habitats, estando presentes desde planícies, lagos e florestas alagadas até correntezas e quedas d'água em cabeceiras de rios (Géry, 1977).

Os serrasalmídeos formam um grupo distinto de peixes caraciformes. Várias espécies são economicamente importantes, representando relevante fração na pesca comercial da Amazônia e muitas são utilizadas na aquicultura (Ortí et al., 1996). Espécies dos gêneros *Collossoma*, *Piaractus* e *Mylossoma* são as mais importantes da família com relação à pesca e aquicultura comercial, além de serem freqüentemente consideradas como alimento de excelente qualidade na América do Sul (Jégu, 2003).

Seus representantes atingem tamanho de médio a grande porte (no máximo um metro de comprimento) e são caracterizados pelo corpo comprimido lateralmente, nadadeira dorsal longa com mais de 16 raios e a presença de escamas abdominais modificadas em forma de serras afiadas. O número de serras é variável, de 6 a 9 em *Acnodon* e até mais de 60 em *Piaractus* (Ortí et al., 2008). A maioria das espécies apresenta espinha pré-dorsal, prolongando-se do osso supraneural, exceção à *Collossoma*, *Piaractus* e *Mylossoma* (Jégu, 2003).

Comparado a outros grupos de peixes neotropicais, a família Serrasalmidae é bem definida, havendo consenso com relação aos gêneros e espécies que devem ser

incluídos na família (Jégu, 2003; Freeman et al., 2007). De acordo com Jégu (2003) e Nelson (2006), a família é composta por 15 gêneros: *Acnodon* (3 espécies), *Catoprion* (1), *Colossoma* (1), *Metynnis* (11), *Mylesinus* (3), *Myleus* (15), *Mylossoma* (3), *Ossobutus* (1), *Piaractus* (2), *Tometes* (2) e *Utiaritichthys* (2), além dos quatro gêneros de piranha, *Serrasalmus* (28), *Pristobrycon* (5), *Pygocentrus* (3 ou 4) e *Pygopristis* (1). Oitenta espécies válidas são documentadas, mas oito estão sob a denominação *Incertae Sedis*.

Os principais caracteres tradicionalmente utilizados na classificação dos serrasalmídeos são a organização e morfologia dos dentes (e.g., Eigenmann, 1915; Géry, 1977). Contudo, outros métodos têm sido empregados na tentativa de elucidar a sistemática do grupo, incluindo estudos de outros caracteres morfológicos (e.g., Gosline, 1951; Machado-Allison, 1985), citogenéticos (Cestari e Galetti Jr., 1992a; Nakayama et al., 2002), parasitológicos (Van Every e Kritsky, 1992) e moleculares (Ortí et al., 1996, 2008; Calcagnotto et al., 2005; Freeman et al., 2007). Embora a maioria dos estudos corrobore o monofiletismo da família Serrasalmidae, as relações internas ainda não estão completamente estabelecidas.

Os serrasalmídeos foram classificados pela primeira vez por Günther (1864) como pertencentes ao grupo Serrasalmonina, família Characinidae. Posteriormente, Eigenmann (1915) redefiniu as subfamílias Serrasalminae e Myleinae, pertencentes à família Characidae. A primeira composta por seis gêneros, *Pygopristis*, *Gastropritis*, *Pygocentrus*, *Rooseveltiella*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus*, todos com uma fileira de dentes em cada maxila. Myleinae, por sua vez, com nove gêneros, exibindo duas fileiras de dentes na pré-maxila. Fowler (1950) elevou-os à categoria de família Serrasalmidae, subdividida em várias subfamílias. Porém, com o trabalho de Greenwood et al. (1966), essa divisão deixou de ter validade, sendo o grupo novamente incluído na família Characidae.

Géry (1977) os redefiniu mais uma vez na família Serrasalmidae. Baseado nos seus hábitos alimentares, a família foi dividida em três subfamílias: (1) Myleinae, com espécies herbívoras, representada pelos gêneros *Myleus*, *Metynnis*, *Acnodon*, *Mylossoma*, *Colossoma* e *Utiaritichthys*, conhecidos como pacus; (2) Serrasalminae, compreendida pelas piranhas e pirambebas, sendo um táxon de hábitos carnívoros e

Cestari e Galetti Jr. (1992a) apresentaram algumas contribuições à filogenia dos serrasalmíneos ao confrontarem seus resultados de citogenética com a árvore proposta por Machado-Allison (1983). Ao analisarem o conjunto de cromossomos na subfamília Serrasalminae, esses autores observaram que o elevado valor diplóide entre os representantes da subfamília é exclusivo em relação a outros peixes da ordem Characiformes. A maioria dos caraciformes apresenta número diplóide de 50 a 54 cromossomos (Oliveira et al., 1988), enquanto os membros de Serrasalminae exibem número diplóide variando de 54 a 64 cromossomos. Assim, acredita-se que os altos valores de número diplóide encontrados entre os serrasalmíneos derivaram de um valor próximo a 50-54 cromossomos e devem ter uma origem comum, concordando com a hipótese de Machado-Allison (1983). A idéia é apoiada pelo fato de *Colossoma* apresentar número diplóide de 54 cromossomos e ter cariótipo semelhante à maioria dos caraciformes. Segundo Cestari e Galetti Jr. (1992a), a hipótese de um cariótipo do tipo de *Colossoma* ter dado origem aos demais serrasalmíneos seria mais “econômica”. Esta hipótese, no entanto, diverge da proposta por Machado-Allison (1983), que colocou *Colossoma* no topo da árvore filogenética.

Mais recentemente, dados moleculares têm sido empregados em estudos das relações filogenéticas dos serrasalmídeos. O primeiro estudo publicado envolvendo seqüências nucleotídicas foi realizado por Ortí et al. (1996), que empregaram análises cladísticas dos genes 12S e 16S do rRNA (RNA ribossômico) mitocondrial, a fim de testar a filogenia de Machado-Allison (1983). Ortí et al. (1996) definiram os serrasalmíneos como um grupo monofilético e delimitaram três grandes grupos dentro da subfamília, em vez de dois, conforme proposto por Machado-Allison (1983). O primeiro sendo representado por *Piaractus*, *Colossoma* e *Mylossoma*, na porção mais basal da árvore, que se alimentam de plantas (folhas, frutos e sementes). *Myleus* e *Mylesinus* formam o segundo grupo, enquanto espécies dos gêneros *Pygocentrus*, *Serrasalmus*, *Pristobrycon* e *Catoprion*, predominantemente carnívoras, juntamente com espécies herbívoras do gênero *Metynnis*, são agrupadas no terceiro clado. O pacu *Acnodon* foi alocado como grupo irmão do clado formado pelas piranhas. Os dados de Ortí et al. (1996) sugerem ainda fortemente que *Pristobrycon* está separado em duas unidades: *Pristobrycon striolatus*, mais relacionado à *Catoprion*, e outras espécies de

Pristobrycon, mais relacionadas a *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Os autores destacam forte evidência da condição não monofilética dos gêneros *Pristobrycon* e *Serrasalmus*.

Deste modo, a hipótese anterior de Machado-Allison (1983), baseada em caracteres morfológicos, não é apoiada pelos resultados obtidos com dados moleculares por Ortí et al. (1996). Entretanto, apesar das relações estabelecidas entre os táxons em ambos os estudos serem diferentes, a linhagem B proposta por Machado-Allison (1983) apresenta a mesma composição taxonômica do terceiro grupo definido por Ortí et al. (1996). Além disso, análises filogenéticas de parasitos hospedeiro-específicos de piranhas (Van Every e Kritsky, 1992) e dados citogenéticos (Porto et al., 1989; Cestari e Galetti Jr., 1992a) apóiam a filogenia de Serrasalminae proposta por Ortí et al. (1996).

Ortí et al. (1996) também reuniram informações citogenéticas disponíveis na época (Oliveira et al., 1988; Porto et al., 1991, 1992; Cestari e Galetti Jr., 1992a) e confrontaram com sua árvore filogenética. Espécies da subfamília Serrasalminae apresentam número diplóide variando de 54 cromossomos em *Colossoma*, *Piaractus* e *Mylossoma* até 64 cromossomos em *Serrasalmus hollandi*; enquanto *Myleus* e *Mylesinus* possuem número diplóide de 58 cromossomos; *Metynnis*, 62 cromossomos; *Catoprion*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e a maioria das espécies de *Serrasalmus*, 60 cromossomos (Muramoto et al., 1968; Cestari e Galetti Jr., 1992a). Foi observado que, com a evolução dos serrasalmídeos, houve evidente aumento do número de cromossomos nas espécies.

Calcagnotto et al. (2005), em estudo mais abrangente envolvendo várias famílias de caraciformes, empregaram análise de parcimônia conjunta de dois marcadores mitocondriais (gene 16S do rRNA e gene mitocondrial citocromo b) e quatro nucleares (genes RAG2, *sia*, *forkhead* e α -tropomiosina). Os resultados alcançados foram inconsistentes com as hipóteses filogenéticas prévias de Machado-Allison (1983) e Ortí et al. (1996), principalmente com relação à posição de *Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus*. Calcagnotto et al. (2005) obtiveram um clado monofilético formado por *Metynnis* e pelas piranhas *Pygocentrus* e *Serrasalmus* posicionado dentro do subgrupo dos pacus (*Colossoma* e *Mylossoma*). Espécies de *Piaractus* compõem um clado que é irmão das piranhas e dos demais pacus. Contudo,

como Calcagnotto et al. (2005) dispuseram de apenas oito dos 15 gêneros de Serrasalmidae, apontaram para o fato de que as relações internas do grupo devem ser interpretadas com precaução. Finalmente, os autores confirmaram a monofilia da família Serrasalmidae, corroborando o *status* de uma família separada (Figura 2).

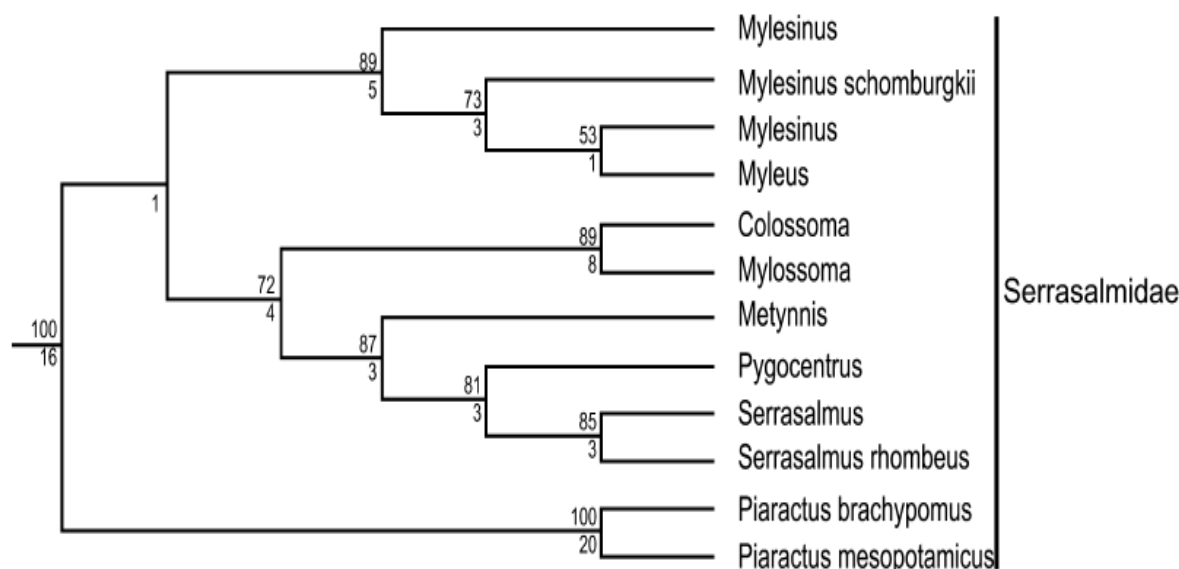


Figura 2 - Filogenia da família Serrasalmidae proposta por Calcagnotto et al. (2005).

Ortí et al. (2008) realizaram o estudo mais abrangente de sistemática molecular de serrasalmídeos até o presente. Devido à pobre resolução dentro de cada clado obtida por causa do baixo nível de variação entre as seqüências dos genes rRNA, no estudo de Ortí et al. (1996), em 2008, houve o uso da região controle do *D-loop* do DNA mitocondrial (mtDNA), por ser mais variável, além dos genes 12S e 16S do rRNA. A partir de análises de máxima parcimônia e inferência Bayesiana, foram identificados os mesmos três agrupamentos de Ortí et al. (1996): clados dos pacus, de *Myleus* e das piranhas. Foram ainda expostas evidências adicionais, como: *Serrasalmus goulding* e espécies de *Pristobrycon* formam um grupo monofilético, que é irmão de outras espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus*; *Catoprion*, *Pygopristis* e *Pristobrycon striolatus* formam um clado que é irmão do descrito anteriormente; e *Mylesinus*, *Tometes* e *Myleus setiger* formam um grupo monofilético.

Como visto anteriormente, apesar dos serrasalmídeos constituírem um grupo notório, a taxonomia e a sistemática desse grupo são um tanto quanto confusas. Por

muito tempo, serrasalmídeos foram considerados uma subfamília dentro da família Characidae. No entanto, recentes estudos filogenéticos sugerem fortemente que a família Characidae seja não-monofilética e que serrasalmídeos não estejam proximalmente relacionados com outros táxons originalmente alocados na subfamília Characinae, ou outras subfamílias da família Characidae (Zanata, 2000). Em vez disso, Calcagnotto et al. (2005) demonstraram que serrasalmídeos podem estar mais proximalmente relacionados a outras famílias (e.g., Anostomidae). Em estudo abrangendo caracteres morfológicos, Mirande (2009) também sugeriu que a subfamília Serrasalmidae fosse excluída de Characidae. Todos esses argumentos apóiam o *status* de uma família separada, porém, sua relação dentro de Characiformes ainda permanece indeterminada (Ortí et al., 2008).

Serrasalmídeos exibem uma variedade de especializações tróficas, sendo encontradas espécies carnívoras, frugívoras e lepidófagas. No entanto, nem todas as espécies são especialistas e seus hábitos alimentares variam conforme idade e disponibilidade de alimento (Winemiller, 1989; Leite e Jégu, 1990). A morfologia e padrão de dentição encontrados nos serrasalmídeos são reflexos do hábito alimentar (Goulding, 1980). Algumas espécies possuem apenas uma fileira de dentes em cada maxila. Estes dentes são afiados, em forma de lâmina, sendo tricúspides em espécies carnívoras dos gêneros *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus* e pentacúspides em *Pygopristys*. Já em *Catoprion*, os dentes são mamiliformes. Todas as outras espécies têm duas séries de dentes na maxila superior e freqüentemente um par de dentes cônicos atrás da fileira principal de dentes da maxila inferior. Em *Acnodon*, *Colossoma*, *Piaractus*, *Metynnis*, *Myleus*, *Mylossoma* e *Utiaritichthys* os dentes são molariformes e fortemente ligados à maxila, sendo usados principalmente para triturar frutos e sementes. Em *Mylesinus*, *Ossobutus* e *Tometes*, os dentes são incisiformes e tricúspides, sendo ligados fracamente à maxila e usados principalmente para cortar folhas (Jégu, 2003).

Gosline, em 1951, formulou a hipótese de que o caráter dentes em série única de piranhas foi derivado evolutivamente da condição primitiva de dentes em duas fileiras de serrasalmídeos herbívoros. O autor supôs que os dentes em duas fileiras teriam sido comprimidos em uma única fileira, durante a evolução dos serrasalmídeos,

resultando na eliminação de um dente. Recentemente, foi descoberto um fóssil pertencente ao grupo serrasalmídeo que confirmou esta hipótese. Cione et al. (2009) encontraram uma grande pré-maxila parcialmente com dentes ao longo do rio Paraná, na cidade de Paraná, na Argentina, em uma região reconhecida por conter fósseis de vertebrados do final do Mioceno. O fóssil foi descrito como *Megapiranha paranensis*, uma nova espécie e novo gênero da família Serrasalmidae, que difere dos outros serrasalmídeos por uma série de características. Embora o fóssil seja distinto dos serrasalmídeos atuais, a morfologia dos dentes compartilha algumas similaridades com as piranhas (e.g., dentes afiados e em forma de lâmina). Além do mais, a organização em zigue-zague dos dentes da pré-maxila do fóssil é intermediária entre os padrões de séries única das piranhas e dupla dos outros serrasalmídeos, sugerindo evidências de como os dentes foram organizados com a origem das piranhas. A posição filogenética de *Megapiranha* foi estabelecida por análise parcimoniosa de traços morfológicos, permitindo inferir que esta espécie é irmã do clado formado pelas piranhas *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus* (Cione et al., 2009).

A maioria dos fósseis de serrasalmídeos está relacionada ao período Mioceno. Reis (1998) aplicou as evidências fósseis de serrasalmídeos ao cladograma de Machado-Allison (1983) e concluiu que todos os gêneros de serrasalmídeos tiveram sua origem na metade do período Mioceno, exceto, provavelmente, por *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus* (Freeman et al., 2007). Lundberg et al. (1986) e Lundberg (1993) afirmaram que os fósseis mais remotos de serrasalmídeos conhecidos são de depósitos correspondentes ao final do Terciário (Épocas Oligoceno e Mioceno), aproximadamente 30-13 milhões de anos de idade.

2.1.3. Piranhas

Piranhas são peixes de água doce, neotropicais e pertencentes à família Serrasalmidae, ordem Characiformes. A maioria das espécies de piranhas ocupa ambientes lênticos (Goulding, 1980; Sazima e Machado, 1990; Agostinho e Júlio Jr., 2002), com exceção de algumas espécies de grande porte, como *S. rhombeus*, que vivem em habitats de rios (Goulding, 1980). São também comuns em diversos reservatórios e regiões alagadas (Villares Jr. et al., 2008). Encontram-se amplamente

distribuídas na América do Sul: 25 espécies ocorrem na bacia do rio Amazonas, 16 no rio Orinoco, nove nas Guianas, três na bacia hidrográfica Paraná-Paraguai e duas no rio São Francisco (Jégu, 2003).

Segundo Braga (1975), são peixes gregários, estacionários e não propriamente migradores, apresentando deslocamentos reduzidos. São peixes sociais que podem formar grupos e atacam suas presas em momentos de distração, desorientação ou quando estas estão se debatendo; são ativos, principalmente durante o dia, e estendem o tempo de forrageamento até o início da noite (Sazima e Machado, 1990).

Tradicionalmente, piranhas ou “piranhas verdadeiras” compreendem apenas os quatro gêneros *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Pygopristis* (Freeman et al., 2007). Alguns autores, como Ortí et al. (1996), Nakayama et al. (2002), Calcagnotto et al. (2005), no entanto, são mais abrangentes, incluindo ao grupo os gêneros *Catoprion* e *Metynnis*. Todavia, o formato dos dentes de *Catoprion* e *Metynnis* é diferente das “piranhas verdadeiras” e, assim como os outros serrasalmídeos, possuem pré-maxila com dentes em duas fileiras (Machado-Allison e Fink, 1995; Freeman et al., 2007). Segundo recente estudo realizado por Freeman et al. (2007), se o termo “piranha” for usado para se referir a um clado monofilético, então esse grupo de peixes deveria se restringir apenas aos gêneros *Serrasalmus*, *Pygocentrus* e *Pristobrycon* (este último, apenas parcialmente), ou ser expandido para incluir, além desses táxons, outros como *Pygopristis*, *Catoprion* e *Pristobrycon striolatus*.

Entre as piranhas, *Serrasalmus* é o gênero mais diverso, com 28 espécies, seguido por *Pristobrycon* (cinco espécies), *Pygocentrus* (três ou quatro) e *Pygopristis* (uma) (Jégu, 2003; Freeman et al., 2007). O número exato de espécies ainda é desconhecido, mas Jégu (2003) reconheceu um total de 38, embora a validade de alguns táxons permaneça questionável. Ademais, muitas outras espécies são descritas continuamente (e.g., Fink e Machado-Allison, 1992, 2001).

Algumas características distinguem esse grupo de peixes de outros serrasalmídeos, sobretudo com relação à morfologia e ao padrão de dentição. Todas as espécies de piranhas exibem apenas uma fileira de dentes nas duas maxilas. Os dentes são fortemente ligados (por meio de pequenas cúspides), sendo usados para perfurar e rasgar; são tipicamente triangulares, pontudos e em formato de lâmina. A maioria das

espécies possui dentes com três cúspides, mas *Pygopristis* apresenta dentes pentacúspides (Machado-Allison, 1985; Freeman et al., 2007).

Vários estudos têm sido direcionados para variações ontogenéticas e temporais da dieta (Goulding, 1980; Machado-Allison e Garcia, 1986; Nico e Taphorn, 1988; Winemiller, 1989) e estratégias alimentares (Nico e Taphorn, 1988; Sazima e Machado, 1990). Tem sido demonstrada uma ampla variedade de hábitos alimentares para diferentes espécies de piranhas (Sazima e Machado, 1990), mas várias exibem dieta onívora, com tendência à piscivoria (Leão et al., 1991; Almeida et al., 1998; Pompeu, 1999; Agostinho et al., 2003), sendo pedaços de nadadeiras e escamas de peixes os principais itens registrados em seus estômagos (Sazima e Machado, 1990; Agostinho e Júlio Jr., 2002).

Embora sejam consideradas essencialmente carnívoras, o hábito alimentar e a morfologia dentária das piranhas se modificam durante sua ontogenia. Os serrasalmídeos, em geral, são caracterizados por suas diversas mudanças ontogenéticas do jovem para adulto. Espécimes juvenis de piranhas têm preferência por nadadeiras de peixes, microcrustáceos, insetos e, em algumas espécies, por sementes (Machado-Allison e Garcia, 1986; Nico e Taphorn, 1988; Pompeu, 1999; Alvim et al., 1999), enquanto os adultos consomem, sobretudo, pedaços de peixes, pequenos peixes inteiros e escamas (Nico e Taphorn, 1988; Magalhães et al., 1990; Almeida et al., 1998; Agostinho et al., 2003; Oliveira et al., 2004; Behr e Signor, 2008). Machado-Allison e Garcia (1986) observaram que *Pygocentrus notatus* (*P. cariba*), *Pristobrycon striolatus* e *Serrasalmus rhombeus*, nos primeiros estágios de desenvolvimento (10-25 mm de comprimento padrão), são caracteristicamente planctívoros. Espécimes entre 40-70 mm de comprimento padrão apresentam uma dieta misturada de nadadeiras de peixes e sementes, enquanto indivíduos maiores de 70 mm mostraram conteúdo estomacal composto por nadadeiras, escamas e pedaços de peixes (*P. cariba*) ou nadadeiras e sementes (*P. striolatus* e *S. rhombeus*). Modificações morfológicas de dentes, maxilas e rastros branquiais também foram relatadas pelos mesmos autores.

O registro fóssil de piranhas é limitado a alguns dentes datados como sendo do período Neogeno (correspondente ao Mioceno, Plioceno, Pleistoceno e Holoceno) (Lundberg, 1998). O mesmo autor, baseado em fósseis de dentes pertencentes à

Serrasalmus, *Pygocentrus* e *Pristobrycon* concluiu que as piranhas evoluíram a partir da metade final do Mioceno, há 11 milhões de anos atrás. Hubert et al. (2007a) determinaram a origem dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, por meio de relógio molecular baseado em seqüências nucleotídicas de regiões do mtDNA (gene 16S do rRNA e *D-loop*), 9 milhões de anos atrás, correspondendo ao final do período Mioceno.

2.1.3.1. Estudos moleculares e citogenéticos em piranhas

Por muitos anos, as piranhas têm fascinado cientistas em todo o mundo, em virtude, principalmente, de suas características biológicas e evolutivas. Entretanto, a sistemática de piranhas ainda tem confundido ictiologistas (Fink, 1993; Fink e Machado-Allison, 2001; Jégu e Santos, 2001) e diversos estudos têm demonstrado grande diversidade ecológica neste grupo de peixes (Machado-Allison, 1985; Jégu e Santos, 1988; Nico e Taphorn, 1988; Jégu et al., 1991; Fink e Machado-Allison, 1992; Machado-Allison e Fink, 1995, 1996).

Freeman et al. (2007) mencionam que a taxonomia e sistemática de piranhas e também de outras espécies de serrasalmídeos são complexas e muito ainda permanece sem solução. Como consequência, a identificação e o posicionamento dentro de árvores filogenéticas são problemáticos. *Serrasalmus* e *Pristobrycon* são os gêneros mais diversos de piranhas e também os mais problemáticos taxonomicamente. Das dificuldades encontradas para definir corretamente as espécies, os autores citam: carência de material para comparação; ausência de características externas precisas e confiáveis que sejam úteis na distinção de gêneros e espécies; ampla variação morfológica intraespecífica; ampla variação intraespecífica no padrão de coloração em espécimes preservados e vivos dentro de uma população e entre localidades; sobreposição dos padrões de coloração e morfologia entre espécies diferentes; conhecimento precário sobre a extensão geográfica das espécies; espécies nominais pouco definidas, aliadas à ausência ou perda do material tipo; provável existência de complexos de espécies (e.g., *Serrasalmus maculatus*, *S. rhombeus*); posicionamento incerto de algumas espécies em *Serrasalmus* versus *Pristobrycon* (e.g., *Serrasalmus serrulatus* ou *Pristobrycon serrulatus*); existência de numerosas sinonímias.

A quantidade de artigos publicados relacionados ao estudo molecular de piranhas é crescente, incluindo trabalhos referentes à filogenia (Ortí et al., 1996, 2008; Freeman et al., 2007), sistemática (Hubert et al., 2006) e biogeografia (Hubert et al., 2007a, 2007b, 2008).

O primeiro trabalho envolvendo estudo molecular de piranhas foi realizado por Ortí et al. (1996), que estabeleceram os padrões e taxas de substituições nucleotídicas nos genes ribossômicos do mtDNA 12S e 16S e os aplicaram em análise filogenética de peixes da subfamília Serrasalminae. As piranhas dos gêneros *Serrasalmus*, *Pygocentrus* e *Pristobrycon* formam uma unidade monofilética juntamente com *Catoprion*, sendo que *Serrasalmus* e *Pristobrycon* são parafiléticos. *Pristobrycon* e *Catoprion* ocupam uma posição mais basal na árvore, enquanto *Serrasalmus* e *Pygocentrus* são os grupos mais derivados. Os autores destacam ainda a grande diferença encontrada entre *Pristobrycon striolatus* e outros *Pristobrycon* analisados, com valor de divergência de 5,8% (valor também encontrado entre o gênero *Myleus* e o clado formado pelas piranhas). Esse resultado está de acordo com Machado-Allison et al. (1989), que também sugeriram a condição parafilética de *Pristobrycon*, uma vez que *P. striolatus* não apresenta o caráter sinapomórfico de espinho pré-anal, presente em todas as outras espécies de *Pristobrycon* e em *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Os quatro espécimes de *Pygocentrus* (*P. nattereri*) constituíram um grupo monofilético, corroborando os resultados de Fink (1993).

Ortí et al. (2008) analisaram seqüências nucleotídicas dos genes ribossômicos 12S e 16S e da região controle mitocondrial (*D-loop*) de espécies da família Serrasalminae. Os autores reconheceram um clado monofilético constituído por piranhas, que é composto pelos gêneros *Serrasalmus*, *Pristobrycon*, *Pygocentrus*, *Pygopristis*, *Catoprion* e *Metynnis* (os autores incluem *Catoprion* e *Metynnis* na denominação “piranhas”). *Serrasalmus goulding* e espécies de *Pristobrycon* formam um grupo monofilético, irmão de outras espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. *Catoprion*, *Pygopristis* e *Pristobrycon striolatus* formam um clado que é irmão do descrito anteriormente.

Dentro do clado das piranhas, *Serrasalmus* e *Pygocentrus* são os grupos mais derivados. *Pygocentrus* constitui um grupo monofilético, mas sua relação com

espécies de *Serrasalmus* não ficou definida. Eles também encontraram *Pristobrycon striolatus* formando um táxon distinto, separado das outras espécies de *Pristobrycon*. A presença de três grupos divergentes de piranhas foi fortemente apoiada pelas seqüências da região controle: (1) *Metynnis*, (2) grupo *Catoprion-Pygopristis-Pristobrycon striolatus* e (3) grupo *Serrasalmus-Pygocestrus*.

Baseados em análises moleculares de seqüências do mtDNA (região controle do *D-loop* e genes do RNA ribossomal 12S e 16S), Freeman et al. (2007) definem as espécies dos gêneros *Serrasalmus*, *Pygocestrus* e *Pristobrycon* (exceto *Pristobrycon striolatus*) formando um clado monofilético. A monofilia é corroborada por algumas características morfológicas e moleculares que os representantes deste grupo compartilham, como presença de espinho pré-anal e dentes ectopterigóides e ausência de seqüências VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats*) na região controle do mtDNA (*D-loop*). Ao contrário, nos outros serrasalmídeos amostrados (*Pristobrycon striolatus*, *Pygopristis* e *Catoprion*), as seqüências VNTR estão presentes, mas o espinho pré-anal é ausente. Portanto, a monofilia dos quatro gêneros que compõem tradicionalmente as “piranhas verdadeiras” (*Serrasalmus*, *Pygocestrus*, *Pristobrycon* e *Pygopristis*) foi rejeitada no respectivo estudo. Conseqüentemente, os autores sugerem que se a terminologia “piranha” se refere a um clado monofilético, então esse grupo de peixes deveria se restringir apenas aos gêneros *Serrasalmus*, *Pygocestrus* e *Pristobrycon* (exceto *Pristobrycon striolatus*), ou ser expandido para incluir, além desses táxons, outros como *Pygopristis*, *Catoprion* e *Pristobrycon striolatus*. Freeman et al. (2007) também encontraram monofilia dos quatro gêneros de piranhas mais *Catoprion* e ainda sugerem que os gêneros *Serrasalmus* e *Pristobrycon* não sejam monofiléticos, em concordância com Ortí et al. (1996).

Em trabalho pioneiro, Hubert et al. (2006) empregaram a metodologia de EPIC-PCR (*Exon-Primed Intron-Crossing – Polymerase Chain Reaction*) em larga escala no estudo de sistemática de peixes. Foi examinado o DNA nuclear de espécies simpátricas de *Serrasalmus* do alto rio Madeira, encontrando elevado nível de polimorfismo e evidências de isolamento reprodutivo em oito das nove espécies nominais de piranhas amostradas, porém não foi possível diferenciar *S. eigenmanni* de *S. spilopleura*. Foi identificada ainda uma nova espécie de *Serrasalmus* (*Serrasalmus*

sp.) que diferiu de seus parentes mais próximos morfológica (*S. rhombeus*) e geneticamente (*S. compressus*) por sete locos diagnósticos ou semidiagnósticos.

Alguns gêneros de piranhas também têm sido usados como grupo modelo em estudos biogeográficos devido a alguns fatores, tais como: existência de diversos estudos de sistemática molecular, endemismo na América do Sul e distribuição relativamente bem documentada das espécies (Hubert et al., 2007a).

Por meio de seqüências mitocondriais (gene ribossomal 16S e região controle do *D-loop*), Hubert et al. (2007a) estudaram as relações filogenéticas de dois gêneros de piranhas, *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, com o objetivo de testar diferentes hipóteses (paleogeografia, hidrogeologia e museu) que explicariam a origem da enorme diversidade encontrada atualmente na região neotropical. Os resultados obtidos revelaram que *Serrasalmus* constitui uma unidade monofilética que foi dividida em três clados distintos, denominados como B1, B2 e B3, todos distribuídos pelas bacias dos rios Amazonas, Orinoco e Paraná. Espécies de *Pygocentrus* também formaram um grupo monofilético que é irmão do agrupamento constituído por espécies de *Serrasalmus*. A análise dos clados permitiu a identificação de cinco eventos vicariantes, várias dispersões e quatro duplicações de linhagens, sugerindo a ocorrência de especiação simpátrica. Os padrões biogeográficos indicaram que as linhagens atualmente presentes no escudo Pré-Cambriano, onde está localizada a bacia do rio Orinoco, são mais antigas do que aquelas das planícies amazônicas, sendo consistentes com a predição da hipótese de museu. As hipóteses paleogeográficas e hidrogeológicas também foram corroboradas, respectivamente, pelos eventos vicariantes que se igualam à distribuição dos paleoarcos e diversos eventos de especiação pós-dispersão identificados. Finalmente, o estudo demonstrou que interações entre geologia, mudanças do nível do mar e hidrografia criaram oportunidades para a cladogênese de piranhas em diferentes escalas temporais e geológicas.

Hubert et al. (2007b) investigaram a influência das flutuações climáticas do Pleistoceno e do atual habitat (diferentes tipos de água presentes na Amazônia) na estrutura genética e fluxo gênico de populações da piranha *Serrasalmus rhombeus* do rio Madeira por meio de análise simultânea de seqüências do mtDNA e polimorfismo

de tamanho de íntrons (EPIC-PCR). Os autores encontraram evidências de estruturação genética mesmo em escalas geográficas pequenas, indicando correlação com distância geográfica em vez de características de habitats. Foi demonstrado também que os refúgios do Pleistoceno contribuíram significativamente para a colonização do alto rio Amazonas durante o Pleistoceno, mas não influenciaram no aumento da diversidade taxonômica de peixes de água doce.

Recentemente, Hubert et al. (2008) trabalharam com seqüências *D-loop* do mtDNA de três espécies simpátricas e endêmicas do alto rio Madeira (*Serrasalmus* sp., *S. compressus* e *S. hollandi*) e evidenciaram um padrão compartilhado de linhagens de mtDNA entre as espécies. O compartilhamento de haplótipos mitocondriais entre *S. compressus* e *Serrasalmus* sp. e entre *S. hollandi* e *Serrasalmus* sp. demonstrou indícios de que, no passado, houve processos de introgressão através de hibridações. O padrão encontrado no estudo revelou uma origem recente na mesma bacia hidrográfica e sugeriu que diferenças adaptativas à variedade de tipos de águas encontradas nas cabeceiras do rio Madeira devem ter sido um fator importante no desenvolvimento do isolamento reprodutivo entre essas espécies endêmicas.

Pode-se observar que alguns dados morfológicos foram corroborados por análises moleculares e concordam no fato de que os gêneros *Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Pygopristis*, *Pristobrycon* e *Catoprion* constituem uma unidade monofilética dentro da família Serrasalmidae, mas as relações internas ainda não estão definidas. Sugere-se que pelo menos dois gêneros (*Serrasalmus* e *Pristobrycon*) não sejam monofiléticos (Fink e Machado-Allison 1992; Ortí et al., 1996; Freeman et al., 2007). Hubert et al. (2007a), porém, propõem uma condição monofilética para *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, com espécies do gênero *Pygocentrus* formando um clado irmão de *Serrasalmus*. Muitas sinapomorfias morfológicas também apóiam a monofilia de ambos os gêneros (Jégu, 2004; Fink, 1993; Ortí et al., 2008). As espécies *Pygopristis denticulata*, *Catoprion mento* e *Pristobrycon striolatus* compõem uma unidade monofilética que é irmã de *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Ortí et al., 1996; Hubert et al., 2007a).

Citogeneticamente, as piranhas são caracterizadas por apresentarem sistema múltiplo de sítios RONS (regiões organizadoras do nucléolo) distribuídos em vários

cromossomos do complemento e localizados preferencialmente nos braços curtos dos cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos (Nakayama et al., 2008).

Entre as piranhas, *Serrasalmus* provavelmente seja o gênero mais estudado citogeneticamente. A maioria das espécies de *Serrasalmus* previamente analisadas possui número diplóide de 60 cromossomos, mas com fórmulas cariotípicas variadas (Nakayama et al., 2002). Muramoto et al. (1968) relataram que *S. hollandi* possui conjunto diplóide de 64 cromossomos e Nakayama et al. (2001) detectaram uma população de *S. rhombeus* com 58 cromossomos. Assim, Cestari e Galetti Jr. (1992a) sugeriram que o número diplóide basal do gênero *Serrasalmus* seja 60 cromossomos, de maneira que os outros valores diplóides representariam condições derivadas. As conclusões de Cestari e Galetti Jr. (1992a) foram corroboradas pelo estudo de Nakayama et al. (2002), ao indicarem que os cariótipos com 64 e 58 cromossomos representariam autopomorfias, uma vez que cada um foi detectado em apenas uma espécie, sugerindo que o número diplóide ancestral para esse gênero seria 60 cromossomos. Cestari e Galetti Jr. (1992a) afirmaram que a evolução cromossômica do gênero *Serrasalmus* tem ocorrido através de mecanismos que resultaram em modificações estruturais do cariótipo, particularmente inversões pericêntricas, que permitiram que o número diplóide básico permanecesse estável.

Encontra-se na literatura relatos da alta diversidade cromossômica intraespecífica dentro do gênero *Serrasalmus*. Estudos citogenéticos realizados por Nakayama et al. (2001) com a piranha *S. rhombeus*, presente na Amazônia Central, próximo à cidade de Manaus, revelaram a ocorrência de dois citótipos que habitam simpatricamente os lagos Catalão e Camaleão. O citótipo 1 consiste de número diplóide igual a 60 cromossomos, sendo 20m (metacêntricos) + 24sm (submetacêntricos) + 6st (subtelocêntricos) + 10a (acrocêntricos) e foi detectado em espécimes do rio Negro (ilhas Anavilhanas), do rio Solimões (lago Camaleão), na confluência dos rios Negro e Solimões (lago Catalão) e no rio Uatumã. O citótipo 2 consiste em 58 cromossomos, sendo 22m + 24sm + 2st + 10a, e está presente nos lagos Catalão e Camaleão. Os citótipos variaram não apenas quanto ao número diplóide e fórmula cariotípica, mas também quanto ao padrão de badeamento C. Como não foram

detectados intermediários, os autores sugeriram que, possivelmente, cada citótipo represente uma espécie de peixe diferente.

Nirchio et al. (2002) descreveram um novo citótipo da espécie *S. rhombeus*, ocorrendo na região de Caicara no rio Orinoco, na Venezuela. Os espécimes apresentaram número diplóide igual a 60 cromossomos, mas com fórmula cariotípica distinta das descritas anteriormente, sendo $30m + 16sm + 4st + 10a$.

Um quarto e novo cariótipo de *S. rhombeus* de ocorrência no rio Catalão foi relatado por Teixeira et al. (2006). Ao estudarem os locos enzimáticos da esterase-D, foram detectadas três zonas de atividade eletroforética, codificadas como *Est-D1*, *Est-D2* e *Est-D3*. Os locos *Est-D1* e *Est-D2* foram monomórficos para todos os indivíduos, enquanto *Est-D3* foi polimórfico, com genótipos e alelos distribuídos diferentemente nos citótipos descritos anteriormente (com números diplóides iguais a 58 e 60 cromossomos; Nakayama et al., 2001), e que serviu como base para detecção de um novo citótipo, também com 60 cromossomos (identificado como “60B”). No citótipo com número diplóide de 58 cromossomos, o loco *Est-D3* foi polimórfico e apresentou quatro genótipos (*Est-D3*¹¹, *Est-D3*¹², *Est-D3*²², *Est-D3*³³). O alelo nulo *Est-D3*⁰ foi exclusivo do citótipo com 60 cromossomos. Já no citótipo 60B, também com 60 cromossomos ($20m + 24sm + 4st + 12a$), o loco *Est-D3* apresentou-se monomórfico (Teixeira et al., 2006).

Por conseguinte, análises cariotípicas das variações intraespecíficas quanto ao número diplóide, fórmula cromossômica, padrão de distribuição da heterocromatina, localização de sítios ribossômicos e locos enzimáticos permitiram a identificação de complexos de espécies em *S. rhombeus*, forma nominal de um complexo composto por seis a nove espécies (*S. rhombeus*, *S. albus*, *S. spilopleura*, *S. marginatus*, *S. brandtii*, *S. sanchezi* e provavelmente, *S. gibbus*, *S. humeralis* e *S. elongatus*) (Nakayama et al., 2001; Frankham et al., 2008).

Outro exemplo de espécie de piranha que apresenta ampla diversidade cariotípica é *Serrasalmus maculatus*. Até recentemente, *S. maculatus* era considerada sinônimo de *Serrasalmus spilopleura*. No entanto, com o trabalho de Jégu e Santos (2001), foi constatado que se tratava de duas espécies diferentes. Segundo esses autores, *S. spilopleura* apresenta a série de ossos infraorbitais mais estreita e a zona da

face mais ampla do que em *S. maculatus*. Dois terços da base da nadadeira caudal são escuros e o último terço é hialino em *S. spilopleura*, enquanto *S. maculatus* apresenta nadadeira caudal com uma faixa negra subterminal ou final, dependendo do tamanho do espécime e do local de coleta. Além disso, a distribuição geográfica dessas espécies nos rios da América do Sul não é a mesma. Enquanto *S. maculatus* apresenta-se amplamente distribuída, sendo encontrada nas regiões das bacias dos rios Amazonas e Paraguai-Paraná, a verdadeira *S. spilopleura* está restrita à bacia do rio Guaporé (Jégu, 2003).

Como consequência, muitos trabalhos envolvendo a espécie *S. maculatus* a descreveram como *S. spilopleura* (e.g., Galetti Jr. et al., 1985; Martins-Santos et al., 1994; Nakayama et al., 2000). Até o momento, foram descritos sete cariótipos diferentes para *S. maculatus*. Apesar de haver grande diversidade na fórmula cariotípica da espécie, o número diplóide de 60 cromossomos é constante.

Cestari e Galetti Jr. (1992b) detectaram três citótipos de espécimes provenientes da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai. No alto rio Paraná, ocorre o citótipo 'a', com conjunto diplóide contendo 60 cromossomos e composto por $20m + 26sm + 4st + 10a$, enquanto no rio Paraguai está presente o citótipo 'b', com o mesmo número diplóide, mas com fórmula cariotípica diferente, sendo $18m + 26sm + 4st + 12a$. Peixes do rio Paraguai diferem daqueles presentes no alto rio Paraná pela ausência do menor par de cromossomos metacêntricos e pela presença do menor par de cromossomos acrocêntricos. Sugere-se que as diferenças observadas na estrutura dos cariótipos entre os indivíduos do alto rio Paraná e rio Paraguai tenham sido desenvolvidas por alopatria. No rio Paraná inferior, foi observado, além do citótipo 'b', um terceiro citótipo que é intermediário aos dois primeiros, sendo provavelmente um "híbrido" resultante de contato secundário entre as duas populações de *S. maculatus*. O citótipo 'c', presente no rio Paraná inferior, apresenta 60 cromossomos, sendo $19m + 26sm + 4st + 11a$. Nesse citótipo, existe apenas um elemento do par correspondente ao menor cromossomo metacêntrico, observado nos indivíduos do alto rio Paraná, e apenas um elemento do par correspondente ao menor cromossomo acrocêntrico dos exemplares do rio Paraguai. Martins-Santos et al. (1994) relataram que espécimes de *S.*

maculatus do rio Baía, bacia do alto rio Paraná, possuem o mesmo cariótipo dos exemplares que apresentam o citótipo 'a' de Cestari e Galetti Jr. (1992b).

Na bacia do rio Amazonas, Nakayama et al. (2000) e Centofante et al. (2002) verificaram a presença de outros quatro citótipos dessa mesma espécie de piranha. Nakayama et al. (2000) detectaram dois citótipos em espécimes de *S. maculatus* em simpatria na região de confluência dos rios Negro e Solimões. Ambos os citótipos apresentam número diplóide igual a 60 cromossomos, mas, enquanto o citótipo 'A' é constituído por $24m + 20sm + 4st + 12a$, o citótipo 'B' contém $24m + 26sm + 10a$, sem cromossomos st. Centofante et al. (2002) descreveram os citótipos 'C' e 'D', de ocorrência no lago Catalão e rio Manacapuru, respectivamente, com número diplóide de 60 cromossomos. O citótipo 'C' apresenta cariótipo formado por $23m + 21sm + 4st + 12a$ e o citótipo 'D', por $24m + 20sm + 4st + 12a$. Um resumo das informações citogenéticas observadas em *Serrasalmus maculatus* e *S. rhombeus* está apresentado no Quadro 1.

Nakayama et al. (2000) concluem que a presença de citótipos encontrados em simpatria e alopatria para *S. maculatus* leva a sugerir que ou essa espécie apresenta ampla heterogeneidade cariotípica, ou existe um complexo de espécies cuja morfologia é muito semelhante. Em virtude da ampla distribuição geográfica e das diferenças encontradas na fórmula cariotípica de populações de *S. maculatus* já relatadas, é possível que esta represente um complexo de espécies crípticas (Cestari, 1990; Hubert et al., 2006).

Outras espécies de *Serrasalmus* também tiveram seus cariótipos descritos por vários pesquisadores. Cestari e Galetti Jr. (1992a) descreveram citogeneticamente *Serrasalmus marginatus* e *S. brandtii* das bacias dos rios Paraguai e São Francisco, respectivamente. Ambas possuem número diplóide de 60 cromossomos, sendo que a primeira apresenta $16m + 26sm + 6st + 12a$ e *S. brandtii*, $18m + 24sm + 8st + 10a$. Martins-Santos et al. (1994) encontraram um segundo citótipo de *Serrasalmus marginatus*, em espécimes do rio Baía, no alto rio Paraná. Apesar de apresentar o mesmo número diplóide (60 cromossomos), a fórmula cariotípica revelou-se distinta dos espécimes descritos anteriormente por Cestari e Galetti Jr. (1992a), com $18m + 26sm + 4st + 12a$.

Quadro 1 - Resumo dos principais dados citogenéticos das piranhas *Serrasalmus rhombeus* e *S. maculatus*. 2n = número diplóide, m = cromossomo metacêntrico, sm = cromossomo submetacêntrico, st = cromossomo subteloicêntrico, a = cromossomo acrocêntrico, NF = número fundamental

Espécie	Citótipo	2n	Fórmula cariotípica				NF	Referência
			m	sm	st	a		
<i>S. rhombeus</i>	1	60	20	24	6	10	110	1
<i>S. rhombeus</i>	2	58	22	24	2	10	106	1
<i>S. rhombeus</i>	-	60	30	16	4	10	110	2
<i>S. rhombeus</i>	-	60B	20	24	4	12	108	3
<i>S. maculatus</i>	a	60	20	26	4	10	110	4 e 7
<i>S. maculatus</i>	b	60	18	26	4	12	108	4
<i>S. maculatus</i>	c	60	18+1	26	4	10+1	109	4
<i>S. maculatus</i>	A	60	24	20	4	12	108	5 e 8
<i>S. maculatus</i>	B	60	24	26	-	10	110	5
<i>S. maculatus</i>	C	60	23	21	4	12	108	6
<i>S. maculatus</i>	D	60	24	20	4	12	108	6 e 8

1. Nakayama et al. (2001); 2. Nirchio et al. (2002); 3. Teixeira et al. (2006); 4. Cestari e Galetti Jr. (1992b); 5. Nakayama et al. (2000); 6. Centofante et al. (2002); 7. Martins-Santos et al. (1994); 8. Nakayama et al. (2002).

Nakayama et al. (2002) relataram que todos os espécimes de *Serrasalmus altispinis*, *S. compressus*, *S. elongatus*, *S. manuely* e *S. maculatus* coletados na bacia do rio Amazonas apresentaram número diplóide igual a 60 cromossomos, mas houve variações interespecíficas nas fórmulas cariotípicas. *Serrasalmus altispinis* apresentou 20m + 28sm + 2st + 10a; *Serrasalmus compressus*, 18m + 30sm + 2st + 10a; *Serrasalmus elongatus*, 22m + 22sm + 4st + 12a; *Serrasalmus manuely*, 22m + 24sm + 6st + 8a e *Serrasalmus maculatus*, 24m + 20sm + 4st + 12a; *Serrasalmus altispinis*, *S. goulding* e *S. serrulatus* do rio Negro também apresentaram valor diplóide igual a 60 cromossomos e NF = 110, de acordo com Nakayama et al. (2008). Entretanto, a fórmula cariotípica apresentou algumas divergências entre as espécies: *Serrasalmus altispinis* possui 24m + 20sm + 6st + 10a, *S. goulding*, 22m + 22sm + 6st + 10a, enquanto que *S. serrulatus* teve 20m + 22sm + 8st + 10a. O cariótipo detectado em

espécimes de *S. altispinis* difere do relatado por Nakayama et al. (2002). Existem, portanto, dois citótipos para *S. altispinis*, diferindo entre si por 4m, 8sm e 4st.

Gaviria et al. (2005) descreveram o cariótipo da espécie *Pygocentrus cariba* da região de Caicara do rio Orinoco, na Venezuela. Eles observaram que a espécie apresenta número diplóide com 60 cromossomos e fórmula cariotípica constituída por $18m + 30sm + 2st + 10a$.

2.2. Ictiofauna de água doce e a relação das bacias hidrográficas do Paraná-Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco

A atual estrutura genética de populações que habitam ambientes de água doce tem sido fortemente afetada pelas alterações nos padrões de drenagem dos rios, devido a processos geomorfológicos e/ou hidrológicos que ocorreram no passado (Hurwood e Hughes, 1998). De acordo com Lundberg et al. (1998), a maior parte da diversidade de peixes de água doce deve ser devida às mudanças paleo-hidrológicas que promoveram dispersão seguida de divergência alopátrica. Os autores enfatizaram ainda que o estabelecimento das maiores bacias hidrográficas da região Neotropical (Amazônica, Orinoco e Paraná) ocorreu durante os últimos 10 milhões de anos (Ma), com eventos de vicariância e de captura de cabeceira sendo comuns entre diferentes bacias.

Apesar do sistema Paraná-Paraguai ter sido separado da bacia Amazônica há 10 milhões de anos atrás (Ma) (Lundberg et al., 1998; Hubert e Renno, 2006), várias evidências sugerem a ocorrência de conexões entre as duas bacias. No Mato Grosso, as cabeceiras das bacias hidrográficas do Amazonas e do Paraguai estão separadas a menos de 100 km de distância e, portanto, não é improvável contato recente entre as mesmas. Lundberg et al. (1998) relataram que, durante os últimos 10 milhões de anos, houve eventos de captura de cabeceira do sistema Paraná pelo Amazônico. Menezes (1972) também descreveu a possibilidade de ter ocorrido, no passado, comunicação entre rios das bacias Amazônica e do Paraguai. Possivelmente, o Paraná médio e inferior receberam sua fauna amazônica por intermédio do rio Paraguai e suas ligações com os rios Madeira e Guaporé, afluentes do rio Amazonas. Acredita-se que, mesmo atualmente, nas épocas de chuva, é provável que ocorra comunicação temporária entre as bacias, com conseqüente troca de faunas nessa região. Hubert e Renno (2006)

sugeriram a existência de duas rotas de dispersão que poderiam ocorrer anteriormente entre rios das bacias Amazônica e Paraguai. A primeira relacionada aos rios Paraguai e tributários ao sul do alto rio Amazonas e a segunda, ligando os rios Paraguai e Tapajós. Em um passado remoto, tais conexões temporárias permitiriam dispersão da ictiofauna entre as bacias.

A separação das bacias do alto rio Paraná e do rio São Francisco ocorreu no período Terciário, entre 65 e 1,8 Ma (Beurlen, 1970). No entanto, com a construção do reservatório de Furnas, na década de 1960, o rio Piumhi, pertencente originalmente à bacia do alto rio Paraná, foi transposto para o rio São Francisco. Consequentemente, a ictiofauna do rio Piumhi e de seus tributários foi transferida para o rio São Francisco, causando mistura da ictiofauna previamente isolada (Moreira-Filho e Buckup, 2005). Além disso, de acordo com Blanco et al. (2010), anteriormente à transposição, existia uma área alagável (Cururu) que poderia ter sido uma provável conexão natural entre os rios Piumhi e São Francisco. Hubert e Renno (2006) relataram também eventos de captura de cabeceira entre o alto rio Paraná e o rio São Francisco. Trocas faunísticas entre o alto rio Paraná e as cabeceiras do rio São Francisco também foram identificadas anteriormente por Montoya-Burgos (2003), em estudo de algumas espécies de *Hypostomus*, há aproximadamente 6 Ma, sugerindo uma provável rota de dispersão entre as duas áreas.

Estudos filogenéticos anteriores argumentaram que as bacias do rio São Francisco e do rio Tocantins foram isoladas mais recentemente, há 5 Ma (Montoya-Burgos, 2003). Contudo, nenhuma provável rota de dispersão entre essas duas bacias foi identificada, permanecendo isoladas uma da outra.

2.3. Marcadores moleculares em estudo de populações naturais de peixes

Até meados da década de 1960, os marcadores utilizados em estudos de sistemática e taxonomia eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral, fenótipos de fácil identificação visual, como coloração, formato de nadadeiras e outros. Os marcadores morfológicos são frequentemente controlados por genes dominantes, o que impede a distinção de indivíduos heterozigotos. Outra limitação é de que nem sempre a percepção de variações

morfológicas é fácil e, muitas vezes, é limitada a caracteres de interesse econômico. Embora eles tenham contribuído significativamente para o desempenho teórico da análise de ligação gênica e para outros estudos de construção das primeiras versões de mapas genéticos (Ferreira e Grattapaglia, 1998), o advento da Biologia Molecular revolucionou os estudos genéticos.

A Biologia Molecular desenvolveu-se de maneira expressiva após a descoberta da estrutura do DNA, em 1953, por Watson e Crick. Desde então, diversas técnicas surgiram, possibilitando a detecção de polimorfismo em nível de DNA. Os marcadores moleculares são ferramentas básicas para estudos de variabilidade genética, sendo constituídos por seqüências de bases nucleotídicas, que podem ou não fazer parte de um gene, tem localização única no genoma e suas variações podem ser rastreadas em diferentes grupos. Os marcadores de DNA são vantajosos para a caracterização de recursos genéticos, porque representam somente a variabilidade genética, não estando sujeitos a influências ambientais, como é o caso dos marcadores morfológicos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Uma das contribuições mais marcantes da Biologia Molecular foi o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por Mullis (1990), que possibilitou estudos genético-moleculares envolvendo um grande número de indivíduos de qualquer tipo de organismo. A técnica de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico do genoma na presença da enzima DNA polimerase. A reação se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), utilizados como iniciadores (primers) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes primers são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR inclui três etapas seqüenciais com alteração de temperatura: denaturação da dupla fita do DNA em aproximadamente 94°C, anelamento dos primers em seqüências homólogas do genoma, com a redução da temperatura para 37-55°C, e alongamento da cadeia de DNA por meio da atuação da enzima termoestável *Taq* DNA polimerase, com a elevação da temperatura para 72°C.

A partir da PCR, surgiram várias derivações, como é o caso do RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) e seqüenciamento de fragmentos de DNA amplificados. Esses marcadores permitem a estimativa de parâmetros genético-populacionais para avaliação do fluxo gênico, diferenciação e distância genética entre populações ou espécies. Em uma das modalidades de análise, as informações são obtidas pela análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos amplificados, entre populações de mesma espécie ou de espécies próximas. A outra abordagem consiste no seqüenciamento dos fragmentos e na análise do polimorfismo das seqüências nucleotídicas em comparações intra e interespecíficas ou, ainda, na reconstrução filogenética, como é o caso dos marcadores mitocondriais (Boni, 2008).

Na última década, a análise do DNA mitocondrial (mtDNA) tornou-se uma ferramenta bem estabelecida e valiosa em estudo de estrutura genética de populações, análises filogenéticas e suas relações evolutivas. O desenvolvimento de metodologias de análise molecular tem permitido a análise do genoma e das variações existentes, tanto em regiões que codificam produtos gênicos, quanto naquelas cuja função permanece desconhecida (Avisé, 2004). O genoma mitocondrial está presente em um grande número de cópias por organela e por célula e, em animais, codifica 13 proteínas mitocondriais, 22 tRNAs, os rRNAs 12S e 16S e também contém regiões que controlam a replicação e a transcrição.

O mtDNA exhibe algumas particularidades que permitem o acúmulo rápido de mutações de ponto que favorecem a identificação de variações entre indivíduos (Brown, 1983). A molécula pode ser útil em análises de genética populacional, uma vez que apresenta características únicas em virtude da sua transmissão materna, ausência de recombinação e por ser uma unidade de DNA independentemente herdada (Avisé, 2004). Algumas seqüências, como genes de tRNA e rRNA, apresentam-se altamente conservadas e permite assim definir primers que podem ser usados para amplificar segmentos de mtDNA em espécies de vertebrados. Estudos de genética molecular têm focalizado na amplificação da região controle do *D-loop* (Chow e Takeyama, 2000; Martins et al., 2003) por causa de sua suposta rápida taxa de substituição, o que a torna ideal para estudos em nível populacional (Sivasundar et al.,

2001). O seqüenciamento do fragmento amplificado da região *D-loop*, geralmente, apresenta polimorfismo e, portanto, é informativo tanto na comparação de populações da mesma espécie quanto na discriminação de espécies próximas de difícil identificação (Meyer, 1994; Prioli et al., 2002).

É amplamente aceito que a região controle do mtDNA acumula mutações mais rapidamente do que genes que codificam proteínas, com algumas exceções. Entretanto, Zhu et al. (1994) compararam taxas e padrões evolutivos de seqüências *D-loop* e do gene citocromo b (*cytb*) de diferentes populações e espécies de peixes de água doce do gênero *Melanotaenia* e descobriram que os níveis gerais de divergência foram muito similares para esses dois segmentos, mas os padrões evolutivos das seqüências variaram. Também em Cipriniformes, foi detectado que, ao considerar apenas espécies proximamente relacionadas, a evolução da região controle foi mais lenta do que as seqüências do gene *cytb* (Tang et al., 2006).

As regiões dos genes citocromo b (*cytb*) e citocromo c oxidase subunidade I (*coxI*) são mais conservadas e, conseqüentemente, mais adequadas para discriminação de grupos muito próximos. Além de ser um dos genes mais conhecidos com relação à estrutura e funcionamento do seu produto protéico, o gene *cytb* é também considerado um dos mais úteis para estudos filogenéticos (Esposti et al., 1993). Segundo Farias et al. (2001), o gene contém códons que evoluem tanto rápida quanto lentamente, assim como regiões conservadas e variadas. Por esse motivo, seqüências *cytb* têm sido utilizadas para uma diversidade de questões sistemáticas, incluindo desde filogenias de níveis hierárquicos maiores, até estudos em nível populacional e de divergência recente (e.g., Cantatore et al., 1994; Rocha-Olivares et al., 1999; Kumazawa e Nishida, 2000; Farias et al., 2001). As seqüências do gene *cytb* provaram conter sinais filogenéticos em vários níveis taxonômicos, inclusive em peixes (Meyer et al., 1990; Perdices et al., 2004; Tang et al., 2006). Essas seqüências também têm sido bastante empregadas como "relógio molecular" na estimativa da cronologia de especiação (Meyer et al., 1990; Irwin et al., 1991; Avise, 2004).

Recentemente, tem sido proposto que a seqüência do gene *coxI* possa servir como base para um sistema de identificação global para animais (Hebert et al., 2003). Para identificar correta e rapidamente as espécies, foram selecionados cerca de 650

pares de bases (pb) do gene mitocondrial *coxI*, cuja seqüência completa em vertebrados possui aproximadamente 1.545 pb. Essa seqüência de 650 pb foi então denominada de “região *barcode*”. A sugestão foi de que cada espécie seria descrita por uma seqüência particular ou por um *cluster* de seqüências muito similares. Ademais, uma vez que os padrões de variação intra e interespecífica em *coxI* são bastante similares em diversos grupos de animais, foi proposto um limiar aleatório: 10 vezes a variação média intraespecífica para o grupo em estudo (Hebert et al., 2004). A partir desse limite seria possível fazer o reconhecimento de mais de 90% das espécies (Hebert et al., 2004). Vários artigos envolvendo a região *barcode* têm sido publicados atualmente e abrangem uma vasta gama de animais, inclusive primatas (Lorenz et al., 2005), aves (Hebert et al., 2004), rotíferos (Birky Jr., 2007), insetos (Rach et al., 2008), peixes (Ward et al., 2005, 2007) e muitos outros.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, C.S. Reproductive aspects of piranhas *Serrasalmus spilopleura* and *Serrasalmus marginatus* into the Upper Paraná River, Brazil. **Braz. J. Biol.**, 3:1-6, 2003.

AGOSTINHO, C.S.; HAHN, N.S.; MARQUES, E.E. Patterns of food resource use by two congeneric species of piranhas (*Serrasalmus*) on the upper Paraná River floodplain. **Braz. J. Biol.**, 63:177-182, 2003.

AGOSTINHO, C.S.; JÚLIO JR., H.F. Observation of an invasion of the piranha *Serrasalmus marginatus* Valenciennes, 1847 (Osteichthyes, Serrasalminidae) into the upper Paraná River, Brazil. **Acta Sci.**, 24:391-395, 2002.

AGOSTINHO, C.S.; AGOSTINHO, A.A.; MARQUES, E.E.; BINI, L.M. Abiotic factors influencing piranha attacks on netted fish in the upper Paraná River, Brazil. **N. Am. J. Fish. Manag.**, 17:712-718, 1997.

ALMEIDA, V.L.L.; HAHN, N.S.; AGOSTINHO, C.S. Stomach content of juvenile and adult piranhas (*Serrasalmus marginatus*) in the Paraná floodplains, Brazil. **Stud. Neotrop. Fauna Environ.**, 33:100-105, 1998.

ALVIM, M.C.C.; OLIVEIRA, A.K.; ALVES, C.B.M.; PERET, A.C. Diet of young *Serrasalmus brandtii* (Teleostei: Serrasalminae) from the Cajuru hydroelectric plant reservoir (MG, Brazil), in relation to the vegetal biomass in the depletion zone. **Multiciência**, 3:94-103, 1999.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2004. 684p.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 18:489-522, 1987.

BEHR, E.R.; SIGNOR, C.A. Distribuição e alimentação de duas espécies simpátricas de piranhas *Serrasalmus maculatus* e *Pygocentrus nattereri* (Characidae, Serrasalminae) do rio Ibicuí, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.**, 98:501-507, 2008.

BEURLEN, K. **Geologie von Brasilien**. Berlin/Stuttgart: Gebrüder Borntraeger, 1970. 444 p.

BIRKY JR., C.W. Workshop on barcoded DNA: application to rotifer phylogeny, evolution, and systematics. **Hydrobiologia**, 593:175-183, 2007.

BIZERRIL, C.R.S.F.; PRIMO, P.B.S. **Peixes de águas interiores do estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: FEMAR - SEMADS, 2001. 417p.

BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; BERTOLLO, L.A.C.; DINIZ, D.; MOREIRA-FILHO, O. Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Rev. Fish Biol. Fish.**, 20: 1-8, 2010.

BONI, T.A. **Comparação molecular de populações naturais de Jaú (Zungaro) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das bacias amazônica e do Paraná-Paraguai**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008. 59p. Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais).

BRAGA, R.A. **Ecologia e etologia das piranhas do nordeste do Brasil (Pisces, *Serrasalmus Lacépède, 1803*)**. Fortaleza: DNOCS, 1975. 268p.

BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: NEI, M.; KOEHN, R.K. (eds.). **Evolution of genes and proteins**. Sinauer: Sunderland, 1983. p. 62-88.

BUCKUP, P.A. **The Characidiinae: A phylogenetic study of the South American darters and their relationships with other characiform fishes**. Ann Harbor: Universidade de Michigan, 1991. 391p. Tese (Doutorado em Biological Sciences).

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 36:135-153, 2005.

CANTATORE, P.; ROBERTI, M.; PESOLE, G.; LUDOVICO, A.; MILELLA, F.; GADALETA, M.N.; SACCONI, C. Evolutionary analysis of cytochrome *b* sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. **J. Mol. Evol.**, 39:589-597, 1994.

CENTOFANTE, L.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon basin. **Caryol.**, 55:37-45, 2002.

CESTARI, M.M. **Diferenciação cromossômica no gênero *Serrasalmus* e evolução do cariótipo em Serrasalminae. Considerações evolutivas e taxonômicas.** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1990. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais).

CESTARI, M.M.; GALETTI JR., P.M. Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and cytotaxonomic considerations about Serrasalminae (Characidae, Pisces). **Rev. Bras. Genet.**, 15:555-567, 1992a.

CESTARI, M.M.; GALETTI JR., P.M. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalmine) from the Paraná-Paraguay rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. **Copeia**, 1:108-112, 1992b.

CHOW, S.; TAKEYAMA, H. Nuclear and mitochondrial DNA analyses reveal four genetically separated breeding units of the swordfish. **J. Fish Biol.**, 56:1087-1098, 2000.

CIONE, A.L.; DAHDUL, W.M.; LUNDBERG, J.G.; MACHADO-ALLISON, A. *Megapiranha paranensis*, a new genus and species of Serrasalminae (Characiformes, Teleostei) from the upper Miocene of Argentina. **J. Vertebrate Paleontol.**, 29:350-358, 2009.

DREW, J.A.; ALLEN, G.R.; ERDMANN, M.V. Congruence between mitochondrial genes and color morphs in a coral reef fish: population variability in the Indo-Pacific damselfish *Chrysiptera rex* (Snyder, 1909). **Coral Reefs**, 29:439-444, 2010.

EBACH, M.C.; CARVALHO, M.R. Anti-intellectualism in the DNA Barcoding Enterprise. **Zool.**, 27: 165-178, 2010.

EIGENMANN, C.H. The Serrasalminae and Myleinae. **Ann. Carnegie Mus.**, 9:226-272, 1915.

ESPOSTI, D.M.; DE VRIES, S.; CRIMI, M.; GHELLI, A.; PATARNELLO, T.; MEYER, A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. **Biochim. Biophys. Acta**, 1143:243-271, 1993.

FARIAS, I.P.; ORTÍ, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; MEYER, A. The cytochrome b gene as phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. **J. Mol. Evol.**, 53:89-103, 2001.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998. 220p.

FINK, W.L. Revision of the piranha genus *Pygocentrus* (Teleostei, Characiformes). **Copeia**, 3:665-687, 1993.

FINK, W.L.; MACHADO-ALLISON, A. *Serrasalmus hastatus*, a new species of piranha from Brazil, with comments on *Serrasalmus altuvei* and *Serrasalmus compressus* (Teleostei, Characiformes). **Occas. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.**, 730:1-18, 2001.

FINK, W.L.; MACHADO-ALLISON, A. Three new species of piranhas from Brazil and Venezuela (Teleostei: Characiformes). **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, 3:55-71, 1992.

FITZHUGH, K. DNA barcoding: an instance of technology-driven science? **Bioscience**, 56:462-463, 2006.

FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. I. **Arq. Zool.**, 6:I-XII, 205-404, 1950.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. 280p.

FREEMAN, B.; NICO, L.G.; OSENTOSKI, M.; JELKS, H.L.; COLLINS, T.M. Molecular systematic of Serrasalminidae: Deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. **Zootaxa**, 1484:1-38, 2007.

GALETTI JR., P.M.; SILVA, E.B.; CERMINARO, R.T. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). **Rev. Brasil. Genet.**, 8:479-484, 1985.

GAVIRIA, J.I.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; ESTRADA, A. Karyotype and nucleolar organizers regions of *Pygocentrus cariba* (Serrasalminae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Interciência**, 30:44-47, 2005.

GAYET, M.; MEUNIER, F.J. Maastrichtian to early late Paleocene freshwater Osteichthyes of Bolivia: additions and comments. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 85-110.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: Tropical Fish Hobbyist Publications, 1977. 672p.

GOULDING, M. **The fishes and forest exploration in Amazonian natural history.** Berkeley: University of California, 1980. 280p.

GREENWOOD, P.H. African chichlidis and evolutionary theories. In: ECHELLE, A.A.; KORNFIELD, I. (eds). **Evolution of fish species flocks.** Orono: Univ. Maine Press, 1984. p. 141-154.

GREENWOOD, P.H.; ROSEN, D.E.; WEITZMAN, S.H.; MYERS, G.S. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, 131:339-354, 1966.

GOSLINE, W.A. Notes on the characid fishes of the subfamily Serrasalminae. **Proc. Calif. Acad. Sci.**, 27:17-64, 1951.

GÜNTHER, A. **Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiatidae in the collection of the British Museum.** Volume fifth. London: Trustees, 1864. 455p.

HADDAD, V.; SAZIMA, I. Piranha attacks on humans in southeast Brazil: epidemiology, natural history, and clinical treatment, with description of a bite outbreak. **Wilderness Environ. Med.**, 14:249-254, 2003.

HARDMAN, M.; LUNDBERG, J.G. Molecular phylogeny and a chronology of diversification for “phractocephaline” catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. **Mol. Phyl. Evol.**, 40:410-418, 2006.

HEBERT, P.D.N.; STOECKLE, M.Y.; ZEMLAK, T.S.; FRANCIS, C.M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biol.**, 2:1657-1663. 2004.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DE WAARD, J.R. Biological identifications through barcodes. **Proc. Roy. Soc. London Ser. B.**, 270:313-322, 2003.

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

HUBERT, N.; TORRICO, J.P.; BONHOMME, F.; RENNO, J-F. Species polyphyly and mtDNA introgression among three *Serrasalmus* sister-species. **Mol. Phyl. Evol.**, 46:375-381, 2008.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; GARCIA-DAVILA, C.; PAUGY, D.; RENNO, J-F. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Mol. Ecol.**, 16:2115-2136, 2007a.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; RIVERA, R.; BONHOMME, F.; D.; RENNO, J-F. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. **Mol. Ecol.**, 16:2488-2503, 2007b.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; RIVEIRA, R.; RENNO, J.-F. Evidence of reproductive isolation among closely related sympatric species of *Serrasalmus* (Ostariophysii, Characidae) from the Upper Madeira River, Amazon, Bolivia. **J. Fish Biol.**, 69:31-51, 2006. (Supl. A).

HURWOOD, D.A.; HUGHES, J.M. Phylogeography of the freshwater fish, *Mogurnda adspersa*, in streams of northeastern Queensland, Australia: evidence for altered drainage patterns. **Mol. Ecol.**, 7:1507-1517, 1998.

IRWIN, D.M.; KOCHER, T.D.; WILSON, A.C. Evolution of cytochrome b gene in mammals. **J. Mol. Biol. Evol.**, 2:13-34, 1991.

JÉGU, M. **Taxinomie des Serrasalminae phytophages et phylogénie des Serrasalminae (Teleostei: Characiformes: Characidae)**. Paris: Muséum National d'Histoire Naturelle, 2004. 423p. Tese (Doutorado em Ictiologia).

JÉGU, M. Subfamily Serrasalminae (Pacus and piranhas). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. (eds.). **Check-List of freshwater fishes from South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 182-196.

JÉGU, M.; SANTOS, G.M. Mise au point à propos de *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 et réhabilitation de *S. maculatus* Kner, 1858 (Characidae: Serrasalminae). **Cybium**, 25:119-143, 2001.

JÉGU, M.; SANTOS, G.M. Le genre *Serrasalmus* (Pisces, Serrasalmidae) dans le bas Tocantins (Brésil, Pará), avec la description d'une espèce nouvelle, *S. geryi*, du bassin Aragaia-Tocantins. **Rev. d'Hydrobiol. Trop.**, 21:239-274, 1988.

JÉGU, M.; LEÃO, E.L.; SANTOS, G.M. *Serrasalmus compressus*, une espèce nouvelle du Rio Madeira, Amazonie (Pisces: Serrasalmidae). **Ichtyol. Explor. Freshwaters**, 2:97-108, 1991.

KUMAZAWA, Y.; NISHIDA, M. Molecular phylogeny of Osteoglossoids: a new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. **Mol. Biol. Evol.**, 17:1869-1878, 2000.

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

LEITE, R.G.; JÉGU, M. Food habits of two species of *Acnodon* (Characiformes, Serrasalminidae) and scale-eating habits of *Acnodon normani*. **Cybium**, 14:353-360, 1990.

LIMA, D.; FREITAS, J.E.P.; ARAÚJO, M.E.; SOLÉ-CAVA, A.M. Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 320:211–223, 2005.

LORENZ, J.G.; JACKSON, W.E.; BECK, J.C.; HANNER, R. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, 360:1869-1878, 2005.

LUCENA, C.A.S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1993. 158p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia).

LUNDBERG, J.G. The temporal context for the diversification of neotropical fishes. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 49-68.

LUNDBERG, J.G.; MARSHALL, L.G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M.C.S.L.; WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American Rivers. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 13-48.

LUNDBERG, J.G. African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. In: GOLDBLATT, P. (ed.). **Biological relationships between Africa and South America**. New Haven: Yale University Press, 1993. p. 156-199.

LUNDBERG, J.G.; MACHADO-ALLISON, A.; KAY, R.F. Miocene characid fishes from Colombia: evolutionary stasis and extirpation. **Science**, 234:208-209, 1986.

MACHADO-ALLISON, A. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia Serrasalminae. Parte III. Sobre el estatus generico y relaciones filogenéticas de los géneros *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* y *Serrasalmus* (Teleostei-Characidae-Serrasalminae). **Acta Biol. Venez.**, 12:19-42, 1985.

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

MACHADO-ALLISON, A.; FINK, W.L. **Los peces Caribes de Venezuela: diagnosis, claves, aspectos ecologicos y evolutivos**. Caracas: Universidade Central de Venezuela, 1996. 149p.

MACHADO-ALLISON, A.; FINK, W.L. **Sinopsis de las especies de la subfamilia Serrasalminae presentes en la cuenca del Orinoco: claves, diagnosis e ilustraciones**. Caracas: Universidade Central de Venezuela, 1995. 102p.

MACHADO-ALLISON, A.; FINK, W.L.; ANTONIO, M.E. Revisión del género *Serrasalmus* Lacepede, 1803 y géneros relacionados em Venezuela: I. Notas sobre La morfología y sistemática de *Pristobrycon striolatus* (Steindachner, 1908). **Acta Biol. Venez.**, 12:140-171, 1989.

MACHADO-ALLISON, A.; GARCIA, C. Food habits and morphological changes during ontogeny in three Serrasalmin fish species of the Venezuelan flood-plains. **Copeia**, 1:193-195, 1986.

MAGALHÃES, E.M.; ALMEIDA, R.G.; GURGEL, H.C.B.; BARBIERI, G. Contribuição ao estudo da alimentação de *Serrasalmus brandtii* (Reinhardt, 1874) (Characiformes, Serrasalmidae) do rio Piranhas-Açu, Pendências, Rio Grande do Norte. **Rev. Ceres**, 37:429-442, 1990.

MAISEY, J.G. Continental break up and the distribution of fishes of Western Gondwana during the early Cretaceous. **Cretaceous Res.**, 21:281-314, 2000.

MARTINS, C.; WASKO, A.P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná river basin. **Genet. Mol. Biol.**, 26:33-38, 2003.

MARTINS-SANTOS, I.C.; JULIO JR., H.F.; SANTOS, S.J. Chromosome study of two species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná River. **Cytologia**, 59:175-181, 1994.

MENEZES, N.A. Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das grandes bacias fluviais do Brasil. In: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí. **Poluição e piscicultura: notas sobre poluição, ictiologia e piscicultura**. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública: Secretaria da Agricultura. Instituto de Pesca da C.P.R.N., 1972. p. 73-78.

MEYER, A. DNA technology and phylogeny of fish. In: BEAUMONT, A.R. (ed.). **Genetics and evolution of aquatic organisms**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 219-249.

MEYER, A. Phylogenetic relationships and evolutionary processes in East African cichlid fishes. **Trends Ecol. Evol.**, 8:279-284, 1993.

MEYER, A.; KOCHER, T.D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A.C. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**, 347:550-553, 1990.

MIRANDE, J.M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, 25:1-40, 2009.

MOREIRA-FILHO, O.; BUCKUP, P.A. A poorly known case of water shed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. **Neotropical Ichthyol.**, 3:449-452, 2005.

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

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. **PLoS Biol.**, 2:1529-1531, 2004.

MULLIS K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci. Amer.**, 262:36-42, 1990.

MURAMOTO, J.; OHNO, S.; ATKIN, N.B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma**, 24:59-66, 1968.

MYERS, G.S. **The piranha book: an account of the ill-famed piranha fishes of the rivers of tropical South America**. Neptune City: T.F.H. Publications, 1972. 128p.

MYERS, G.S. **Freshwater fishes and West Indian zoogeography**. Annu. Rep. Smithon. Inst., 1938. p. 339-364.

NAKAYAMA, C.M.; FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A.C. Mapping of ribosomal genes and chromosomal markers in three species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Amazon basin. **Genet. Mol. Biol.**, 31:868-873, 2008.

NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. A comparative cytogenetic study of five piranha species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. **Genetica**, 114:231-236, 2002.

NAKAYAMA, C.M.; JEGÚ, M.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. **Copeia**, 3:866-869, 2001.

NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Ocorrência de dois citótipos em *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characiformes, Serrasalmidae) da região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. **Acta Amaz.**, 30:149-154, 2000.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. Hoboken: John Wiley, 2006. 601p.

NICO, L.G.; TAPHORN, D.C. Food habits of piranhas in the low llanos of Venezuela. **Biotropica**, 20:311-321, 1988.

NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; RON, E.; PÉREZ, J.E. Karyotype and nucleolar organizer regions in *Serrasalmus rhombeus* (Serrasalminae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Interciência**, 27:676-678, 2002.

OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; BIGNOTTO, T.S.; JÚLIO JR.; H.F., CARRER, H., AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, L.M., Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. **J. Fish Biol.**, 69:260-277, 2006. (Suppl. B).

OLIVEIRA, A.K.; ALVIM, M.C.C.; PERET, A.C.; ALVES, C.B.M. 2004. Diet shifts related to body size of the pirambeba *Serrasalmus brandtii* Lütken, 1875

(Osteichthyes, Serrasalminae) in the Cajuru reservoir, São Francisco River basin, Brazil. **Braz. J. Biol.**, 64:117-124, 2004.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H.A.; TOLEDO FILHO, S.A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. **Rev. Bras. Genet.**, 11:577-624, 1988.

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

ORTÍ, G.; SIVASUNDAR, A.; DIETZ, K.; JÉGU, M. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genet. Mol. Biol.**, 31:343-351, 2008. (Supl. 1).

ORTÍ, G.; PETRY, P.; PORTO, J.I.R.; JÉGU, M.; MEYER, A. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. **J. Mol. Evol.**, 42:169-182, 1996.

ORTÍ, G.; VARI, R.P. **Characiformes**. Disponível em: <http://www.unl.edu/museum/research/systematics/Orti/>. Acesso em: 20, novembro, 2009.

PARK, L.K.; MORAN, P. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. **Rev. Fish Biol. and Fish.**, 4:272-299, 1994.

PERDICES, A.; CUNHA, C.; COELHO, M.M. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (= Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences. **Mol. Phyl. Evol.**, 31:192-203, 2004.

POMPEU, P.S. Dieta da pirambeba *Serrasalmus brandtii* Reinhardt (Teleostei, Characidae) em quatro lagoas marginais do rio São Francisco, Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, 16:19-26, 1999. (Supl. 2).

PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E.; NAKAYAMA, C.; FALCÃO, J.N. A checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. **Rev. Hydrobiol. Trop.**, 25:287-299, 1992.

PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E.; NAKAYAMA, C.M.; MAIA, R.O.; JÉGU, M. Cytotaxonomic analysis in the Serrasalminidae (Ostariophysi, characiformes). In: VII CONGRESS OF ICHTHYLOGY. Amsterdam, 1991. **Abstracts...** Amsterdam: Bull. Zool. Mus. Univ., 1991, p. 66-66

PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E.; NAKAYAMA, C.M.; JÉGU, M. Análise cariotípica na família Serrasalminidae (Ostariophysi, Characiformes): aspectos evolutivos. **Ciênc. Cult.**, 41:714, 1989. (Supl.).

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO JR., H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Gen. Mol. Biol.**, 25:421-430, 2002.

RACH, J.; DE SALLE, R.; SARKAR, I.N.; SCHIERWATER, B.; HADRY, H. Character-based DNA barcoding allows discriminations of genera, species and population in Odonata. **Proc. R. Soc. B.**, 275: 237-245, 2008.

REIS, R.E. Systematics, biogeography, and the fossil record of the Callichthyidae: a review of the available data. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 351–374.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J.; (eds.). **Check list of freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 742p.

ROCHA-OLIVARES, A.; ROSENBLATT, R.H.; VETTER, R.D. Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the rockfish subgenus *Sebastomus* (*Sebastes*, Scorpaenidae) based on mitochondrial cytochrome b and control region sequences. **Mol. Phyl. Evol.**, 11:441-458, 1999.

SAZIMA, I.; MACHADO, F.A. Underwater observations of piranhas in western Brazil. **Environm. Biol. Fishes**, 28:17-31, 1990.

SCHULTE, W. **Piranhas in the aquarium**. Neptune City: T.F.H. Publications, 1988. 172p.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTI, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Mol. Ecol.**, 10:407-417, 2001.

TANG, Q.; LIU, H.; MAYDEN, R.; XIONG, B. Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome b gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). **Mol. Phyl. Evol.**, 39:347-357, 2006.

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

UJ, A. **Étude comparative de l'ostéologie crânienne des poissons de la famille des Characidae et son importance phylogénétique**. Genève, Switzerland: Faculté des Sciences de l'Université de Genève, 1990. 261p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).

VAN EVERY, L.R.; KRITSKY, D.C. Neotropical Monogenoidea. 18. *Anacanthorus* Mizelle and Price, 1965 (Dactylogyridae, Anacanthorinae) of piranha (Characoidea, Serrasalmidae) from the central Amazon, their phylogeny, and aspects of host-parasit coevolution. **J. Helminthol. Soc. Wash.**, 59:52-75, 1992.

VARI, R.P. The Neotropical fish family Ctenoluciidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): Supra and intrafamilial phylogenetic relationships, with a revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, 564: 1-97, 1995.

VILLARES JR., G.A.; GOMIERO, L.M.; GOITEIN, R. Alimentação de *Serrasalmus maculatus* (Kner, 1858) (Characiformes; Serrasalmidae) no trecho inferior da bacia do rio Sorocaba, São Paulo, Brasil. **Acta Sci. Biol. Sci.**, 30:267-273, 2008.

WARD, R.D.; HOLMES, B.H. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (coxI) in fishes. **Mol. Ecol. Notes**, 7:899-907, 2007.

WARD, R.D.; ZEMLAK, S.Z.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. **Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.**, 360:1847-1857, 2005.

WEITZMAN, S.H. The osteology of *Brycon meeki*, a generalized characid fish, with an osteological definition of the family. **Stanford Ichthyol. Bull.**, 8:1-77, 1962.

WINEMILLER, K.O. Dynamic diversity: Fish communities of tropical rivers. In: CODY, M.L.; SMALLWOOD, J.A. (eds.). **Long-term studies of vertebrate communities**. Orlando: Academic Press, 1996. p. 99-134.

WINEMILLER, K.O. Ontogenetic diet shifts and resource partitioning among piscivorous fishes in the Venezuelan Llanos. **Env. Biol. Fishes**, 26:177-199, 1989.

ZANATA, A.M. **Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon* Müller & Troschel, 1844 (Characidae, Characiformes)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2000. 358p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).

ZHU, D.; JAMIESON, B.G.; HUGALL, A.; MORITZ, C. Sequence evolution and phylogenetic signal in control-region and cytochrome b sequences of rainbow fishes (Melanotaeniidae). **Mol. Biol. Evol.**, 11:672-683, 1994.

CAPÍTULO I

Evidências genéticas para um complexo de espécies em *Serrasalmus maculatus* (Characiformes, Serrasalminidae) das bacias hidrográficas Paraná-Paraguai e Tocantins

RESUMO

A piranha *Serrasalmus maculatus* apresenta-se amplamente distribuída pelos rios das bacias Amazônica e Paraná-Paraguai. Além da extensa distribuição geográfica, diferenças cariotípicas detectadas anteriormente entre populações de *S. maculatus* de diferentes localidades indicam a possibilidade de um complexo de espécies. Marcadores moleculares mitocondriais foram utilizados com o objetivo de caracterizar e diferenciar populações de *S. maculatus* dos rios Tocantins, alto Paraguai e alto Paraná. Sequências parciais da região controle do *D-loop* e dos genes citocromo b e citocromo c oxidase I foram analisadas. O *D-loop* exibiu repetições em tandem de motivos curtos (12 pares de bases) apenas na população da bacia dos rios Paraná-Paraguai. Essas repetições variaram em número, dependendo do espécime, o que resultou na variação de tamanho dos produtos de PCR. Todas as sequências mitocondriais utilizadas nesse trabalho sugerem que *S. maculatus* contenha diferentes linhagens do DNA mitocondrial. Embora a amostragem tenha sido restrita apenas a três bacias hidrográficas, as análises filogenéticas claramente indicaram que a espécie atualmente denominada como *S. maculatus* apresenta elevada variabilidade genética. Análises *neighbor-joining* identificaram agrupamentos das populações de acordo com suas localidades, no entanto, a maior diferenciação genética foi observada entre as populações das bacias do rio Tocantins e do sistema Paraná-Paraguai. As divergências observadas entre essas populações foram equivalentes ao registrado na literatura entre muitas espécies próximas, indicando que as populações de *S. maculatus* do rio Tocantins e da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai devem corresponder, provavelmente, a espécies diferentes. Portanto, *S. maculatus* deve ser considerada um complexo de espécies morfologicamente semelhantes entre si.

**Genetic evidence for a species complex within *Serrasalmus maculatus*
(Characiformes, Serrasalminidae) from Paraná-Paraguai and Tocantins River
basins**

ABSTRACT

The piranha *Serrasalmus maculatus* is widely distributed through Amazon and Paraná-Paraguai River basins. In addition, karyotypic differences among *S. maculatus* populations from distinct localities were previously detected and suggest the possibility of a species complex. Mitochondrial molecular markers were employed in order to characterize *S. maculatus* populations from Tocantins, upper Paraguai and upper Paraná River basins. Partial sequences of control region (D-loop) and cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes were analyzed. Control region sequences of *S. maculatus* population from Paraná-Paraguai River basin exhibited tandem repeats of short motifs (12 base pairs) and variable numbers, depending on specimens, accounting for length variation. Mitochondrial sequences utilized in the present work suggested that *S. maculatus* encompass different mitochondrial DNA lineages. Although sampling was restricted to only three river basins, phylogenetic analysis clearly indicated that the species currently recognized as *S. maculatus* presents high genetic variability. Neighbor-joining analysis clustered *S. maculatus* populations according to their locations. However, the highest genetic differentiation was identified between populations from Tocantins and Paraná-Paraguai River basins. The analysis of all mitochondrial sequences evidenced genetic differentiation between these two populations corresponding to related, but different species, suggesting that *S. maculatus* from Tocantins River and from Paraná-Paraguai River basins should comprehend most likely, different species. Therefore, *S. maculatus* should be considered a complex of species morphologically very similar to each other.

1. INTRODUÇÃO

Peixes do gênero *Serrasalmus*, popularmente conhecidos como “piranhas”, estão incluídos na família Serrasalmidae (ordem Characiformes). Segundo Goulding (1980), o gênero está distribuído nas porções tropicais da América do Sul, a oeste da Cordilheira dos Andes, habitando uma grande variedade de ambientes aquáticos, sendo abundante nas bacias dos rios Orinoco, Solimões-Amazonas, Paraná-Paraguai e São Francisco.

Serrasalmus maculatus Kner (1858) é uma das espécies de piranhas de mais ampla distribuição geográfica, ocorrendo naturalmente nas bacias hidrográficas Amazônica e Paraná-Paraguai. Essa espécie é caracterizada morfológicamente pelo corpo alto e comprimido lateralmente, uma série única de dentes em ambas as maxilas e uma quilha serrilhada no peito, formada por escamas modificadas em forma de espinhos (Machado-Allison e Garcia, 1986). Segundo Sazima e Machado (1990), *Serrasalmus maculatus* nada em pequenos cardumes, em grupos de 20 a 30 espécimes e apresenta dieta bastante diversificada. Apesar da alimentação ser predominantemente piscívora, insetos aquáticos e crustáceos fazem parte da dieta da espécie (Agostinho et al., 2003; Costa et al., 2005).

Por muito tempo, *Serrasalmus maculatus* foi considerada sinônimo de *S. spilopleura*. No entanto, Jégu e Santos (2001) relatam que *S. maculatus* e *S. spilopleura* correspondem, de fato, a duas espécies diferentes. Talvez, a característica mais marcante que diferencie as duas espécies seja com relação à coloração da nadadeira caudal. Enquanto *S. spilopleura* possui dois terços da base da nadadeira caudal escuros e o último terço hialino, *S. maculatus* apresenta a nadadeira caudal com uma faixa negra terminal ou subterminal, dependendo do tamanho do espécime e do local de coleta. Além disso, enquanto *S. maculatus* encontra-se amplamente distribuída, a verdadeira *S. spilopleura* está restrita à bacia do rio Guaporé.

Serrasalmus maculatus já teve seu cariótipo descrito a partir de espécimes provenientes de diferentes localidades das bacias dos rios Amazonas e Paraná-Paraguai (Cestari e Galetti Jr., 1992b; Martins-Santos et al., 1994; Nakayama et al., 2000, 2002; Centofante et al., 2002). Todos os indivíduos apresentam número diplóide

de 60 cromossomos e sistema múltiplo de regiões organizadoras do nucléolo (RONs), localizado no braço curto dos cromossomos acrocêntricos. Contudo, alta diversidade cromossômica intraespecífica foi relatada por meio da observação de sete cariótipos distintos: três de ocorrência na bacia do sistema Paraná-Paraguai e o restante na bacia Amazônica, sendo dois deles em simpatria (Nakayama et al., 2000).

A elevada heterogeneidade cariotípica de *S. maculatus* aliada à ampla distribuição geográfica da espécie levou alguns pesquisadores a sugerirem que *S. maculatus* possa representar um complexo de espécies, cuja morfologia seja muito semelhante (Cestari, 1990; Nakayama et al., 2000; Hubert et al., 2006).

Diferentes segmentos do DNA mitocondrial (mtDNA) podem ser utilizados em estudos populacionais, mas algumas regiões da molécula são mais adequadas para análises de espécies muito próximas ou até mesmo para análises intraespecíficas. A região controle do *D-loop* é uma das mais empregadas para essas finalidades (Sivasundar et al., 2001; Prioli et al., 2002; Avise, 2004; Oliveira et al., 2006). Mutações acumulam-se mais rapidamente na região controle e, portanto, esse segmento é útil em estudos genético-populacionais e evolutivos entre espécies muito próximas (Sivasundar et al., 2001; Avise, 2004). Apesar de serem relativamente mais conservadas, regiões codificantes do mtDNA também são comumente empregadas em estudos de populações naturais, como é o caso dos genes citocromo b (*cytb*) e citocromo c oxidase subunidade I (*coxI*) (Hebert et al., 2003; Lima et al., 2005; Toffoli et al., 2008; Drew et al., 2010).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar molecularmente, por meio de marcadores mitocondriais, as populações naturais da piranha *Serrasalmus maculatus* das bacias dos rios Paraná-Paraguai e Tocantins, com a finalidade de detectar a existência de um possível complexo de espécies crípticas. Ampliar-se-ão, dessa maneira, as informações sobre a variabilidade genética das populações de *S. maculatus* dessas bacias hidrográficas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

No total, 40 exemplares de *Serrasalmus maculatus* foram coletados nas bacias dos rios Paraná-Paraguai e Tocantins (Figura 1). Amostras das espécies analisadas foram depositadas na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), da Universidade Estadual de Maringá, e no Laboratório de Ictiologia e Sistemática da Universidade Federal do Tocantins (Quadro 1; Anexo 1). Após a coleta, uma amostra de tecido muscular dos indivíduos foi fixada em álcool etílico comercial, em frascos individuais. Em seguida, os frascos foram vedados com tampa plástica e estocados em freezer a -20°C para preservação das amostras até o momento de extração do material genético.

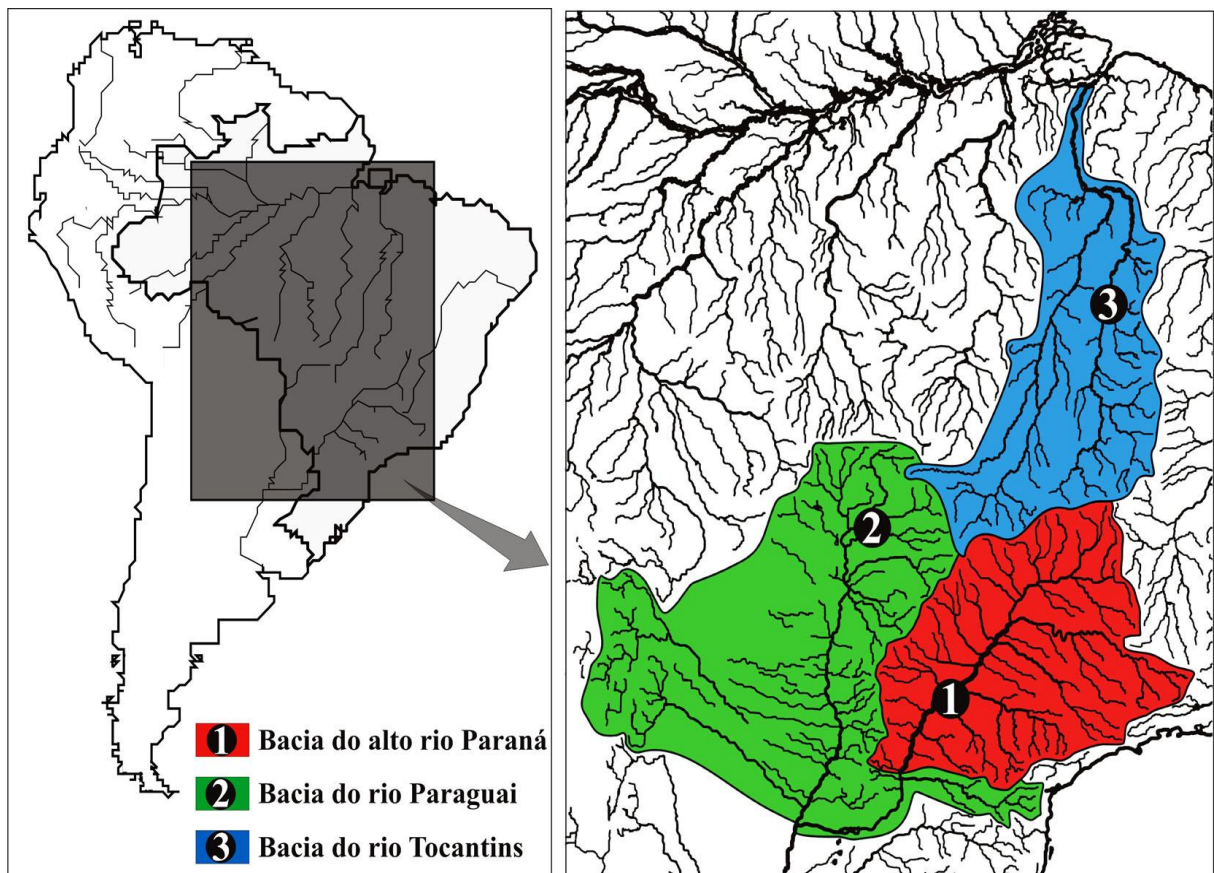


Figura 1 - Áreas de coleta de *Serrasalmus maculatus*. Os números correspondem aos pontos de amostragem: (1) planície de inundação do alto rio Paraná, (2) rio Manso e (3) rio Tocantins.

Quadro 1 - Lista das amostras de *Serrasalmus maculatus* analisadas neste trabalho (Código: abreviação das espécies; N: número de indivíduos analisados; Testemunho: NUP – número de catálogo na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura, Nupélia; UNT – Laboratório de Ictiologia e Sistemática da Universidade Federal do Tocantins)

Código	Local de coleta	N	Testemunho
SmcTO	Rio Tocantins	11	UNT 8175
SmcMS	Alto rio Paraguai (Rio Manso)	11	NUP 884
SmcPL	Alto rio Paraná (Planície de Inundação)	7	NUP 4208
SmcRB	Alto rio Paraná (Rio Baía)	6	NUP 4208
SmcLG	Alto rio Paraná (Lagoa das Garças)	5	NUP 4208

Além disso, também foram incluídas nas análises amostras de outras espécies dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, bem como algumas sequências disponibilizadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Quadro 2), com a finalidade de realizar comparações inter e intraespecíficas e enraizamento das árvores filogenéticas.

Quadro 2 - Espécies, código amostral, número de acesso no *GenBank* e local de coleta dos espécimes analisados. A localidade das amostras está de acordo com a seguinte abreviação: PR – alto rio Paraná; MS – rio Manso (bacia do alto rio Paraguai); TO – rio Tocantins; UR – rio Uruguai; AM – bacia do rio Amazonas; OR – bacia do rio Orinoco; SF – rio São Francisco; NC – localidade desconhecida. O segmento do DNA mitocondrial utilizado nas análises está indicado para cada espécie

Espécie	Amostra	Acesso	Local	Regiões do DNA mitocondrial	Ref.
<i>Serrasalmus marginatus</i>	MgnLG03	-	PR	<i>Cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus marginatus</i>	MgnMS33	-	MS	<i>Cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus marginatus</i>	MgnMS45	-	MS	<i>CoxI</i>	1
<i>Serrasalmus marginatus</i>	MgnRB09	-	PR	<i>D-loop</i>	1
<i>Serrasalmus marginatus</i>	MgnPL01	-	PR	<i>D-loop</i>	1
<i>Serrasalmus marginatus</i>	MgnPL06	-	PR	<i>D-loop</i>	1
<i>Serrasalmus marginatus</i>	MgnPL08	-	PR	<i>D-loop</i>	1
<i>Serrasalmus maculatus</i>	-	AF283948	UR	<i>D-loop</i>	2
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	RmbTO04	-	TO	<i>Cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	RmbTO05	-	TO	<i>Cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	-	AF283951	AM	<i>D-loop</i>	2
<i>Serrasalmus eigenmanni</i>	EgmGR39	-	TO	<i>Cytb, coxI</i>	1

Quadro 2, Cont...

<i>Serrasalmus eigenmanni</i>	-	AF283946	NC	<i>D-loop</i>	2
<i>Serrasalmus gouldingi</i>	-	AF283944	AM	<i>D-loop</i>	2
<i>Serrasalmus gouldingi</i>	-	AF283945	NC	<i>D-loop</i>	2
<i>Serrasalmus gouldingi</i>	-	EF543731	OR	<i>D-loop</i>	3
<i>Serrasalmus manuelei</i>	-	EF543722	OR	<i>D-loop</i>	3
<i>Serrasalmus manuelei</i>	-	AF283950	AM	<i>D-loop</i>	2
<i>Serrasalmus medinai</i>	-	EF543730	OR	<i>D-loop</i>	3
<i>Serrasalmus serrulatus</i>	-	AF283947	AM	<i>D-loop</i>	2
<i>Serrasalmus irritans</i>	-	EF543729	OR	<i>D-loop</i>	3
<i>Serrasalmus brandtii</i>	BdtSF325	-	SF	<i>Cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO38	-	TO	<i>D-loop, cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO56	-	TO	<i>D-loop, cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO57	-	TO	<i>D-loop, cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO59	-	TO	<i>D-loop, cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO60	-	TO	<i>D-loop, cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO61	-	TO	<i>Cytb, coxI</i>	1
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO62	-	TO	<i>Cytb</i>	1
<i>Serrasalmus</i> sp.	-	EF543737	OR	<i>D-loop</i>	3
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrTO19	-	TO	<i>Cytb, coxI</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrTO21	-	TO	<i>D-loop</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrTO22	-	TO	<i>D-loop</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrTO24	-	TO	<i>D-loop</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrTO30	-	TO	<i>D-loop</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrTO31	-	TO	<i>D-loop</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrTO32	-	TO	<i>D-loop</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrMS01	-	MS	<i>D-loop, cytb, coxI</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrMS02	-	MS	<i>D-loop</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrMS10	-	MS	<i>D-loop</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	NtrMS24	-	MS	<i>D-loop</i>	1
<i>Pygocentrus nattereri</i>	-	AF283953	NC	<i>D-loop</i>	2
<i>Pygocentrus cariba</i>	-	AF283954	OR	<i>D-loop</i>	2
<i>Pygocentrus cariba</i>	-	EF543738	OR	<i>D-loop</i>	3
<i>Pygocentrus piraya</i>	PrySF499	-	SF	<i>Cytb</i>	1
<i>Pygocentrus piraya</i>	PrySF502	-	SF	<i>Cytb</i>	1
<i>Pygopristis denticulatus</i>	-	EF543743	OR	<i>D-loop</i>	3
<i>Piaractus brachypomus</i>	-	AY791429	NC	<i>Cytb</i>	4
<i>Piaractus brachypomus</i>	-	FJ978042	NC	<i>CoxI</i>	5

Referências: 1. Presente estudo; 2. Ortí et al. (2008); 3. Freeman et al. (2007); 4. Calcagnotto et al. (2005); 5. Ardura et al. (2010).

2.2. Áreas de estudo

2.2.1. Planície de inundação do alto rio Paraná

O rio Paraná, principal rio da bacia do Prata, é o décimo maior do mundo em descarga e, de sua nascente no Planalto Central, na confluência dos rios Paranaíba e Grande, percorre 4.695 km até chegar à foz, no estuário do Prata. Seu trecho superior,

alto e parte do médio, encontra-se em território brasileiro, drenando uma área de 891.000 km² (Paiva, 1982). Na margem direita do terço inferior do alto rio Paraná, entre o remanso do reservatório de Itaipu e a barragem de Porto Primavera, encontra-se uma planície com aproximadamente 200 km de extensão e 20-30 km de largura. A planície de inundação era ainda mais extensa, mas parte de seu território foi encoberta pelo reservatório da hidrelétrica de Porto Primavera. Na região da planície de inundação, encontra-se o único segmento do rio Paraná, em território brasileiro, ainda não represado. A planície de inundação do alto rio Paraná é constituída por intensa rede de canais secundários, o rio Baía e os cursos inferiores de rios marginais e várzeas. Antes da formação do reservatório de Porto Primavera, a área era freqüentemente alagada na época chuvosa do ano. Atualmente, as inundações estão dependentes da abertura das comportas de usinas situadas à montante da planície.

As coletas foram realizadas no rio Baía e na lagoa das Garças, nos pontos de coordenadas geográficas 22°43'S; 53°17'W e 22°43'S; 53°13'W, respectivamente, além de outros pontos da planície de inundação do alto rio Paraná. O rio Baía é um tributário da margem direita do rio Paraná. Sua foz está situada no rio Paraná, mas se conecta ao rio Ivinhema pelo canal Corutuba. Apresenta velocidade e fluxo influenciados pelas variações do nível dos rios Paraná e Ivinhema. No período das cheias, durante o alagamento, o fluxo de água inverte-se, com a água do rio Paraná entrando no rio Baía. Pelas suas características, o rio Baía é considerado semi-lótico. A lagoa das Garças está localizada na margem direita do rio Paraná. É caracterizada como ambiente lântico, mas mantém conexão permanente com a calha do rio Paraná por um canal de 2-4 m de largura e cerca de 150 m de comprimento.

2.2.2. Bacia do alto rio Paraguai

O rio Manso, onde foi construído o reservatório APM Manso, pertence à bacia do alto rio Paraguai, sendo afluente da margem esquerda do rio Cuiabá que, por sua vez, desemboca na margem esquerda do rio Paraguai, no Estado do Mato Grosso. Cerca de 80 km após confluência com o rio da Casca, o rio Manso se junta ao rio Cuiabazinho, formando então o rio Cuiabá. A bacia hidrográfica do rio Manso

apresenta área aproximada de 9.365 km². As coletas foram realizadas no rio Manso, no ponto de coordenadas geográficas 14° 48'S; 50° 06'W.

2.2.3. Bacia hidrográfica Araguaia-Tocantins

A bacia hidrográfica Araguaia-Tocantins drena 767.000 km², dos quais 343.000 km² correspondem à sub-bacia do rio Tocantins, 382.000 km² ao rio Araguaia (seu principal afluente) e 42.000 km² ao rio Itacaiunas (o maior contribuinte do curso inferior). O rio Tocantins é formado a partir dos rios Almas e Maranhão, cujas nascentes situam-se na região central do País, Planalto de Goiás, e percorre cerca de 2.400 km até a sua foz. É limitado pelas bacias hidrográficas do Paraná-Paraguai (Sul), do Xingu (Oeste), do São Francisco (Leste) e Parnaíba (Nordeste). As coletas foram realizadas no córrego Traçadal, pequeno afluente da margem direita que desemboca no rio Tocantins próximo da foz do rio Paranã, no ponto de coleta de coordenadas geográficas 12° 36'S; 48° 11'W.

2.3. Extração do DNA genômico

O DNA total de cada amostra foi extraído segundo metodologia baseada em fenol/clorofórmio (Monesi et al., 1998), com algumas modificações. Amostras de tecido muscular retiradas de cada peixe foram maceradas e homogeneizadas em 500 µL de tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%), 500 µL de tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Espermidina 0,15 mM) e 5 µL de proteinase K (20 µg/µL) por duas horas em banho-maria com agitação a 50°C. Posteriormente, o DNA foi purificado com fenol/clorofórmio (1:1, v:v) e clorofórmio, respectivamente, sendo centrifugado a 12.000 rpm durante 12 minutos.

O DNA extraído foi precipitado com adição de solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado, seguido de incubação a -20°C por 12-24 horas. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* obtido foi lavado com etanol 70% e ressuscitado em 30 µL de tampão TE (Tris-HCl 1 mM pH 8 e EDTA 0,1 mM) contendo RNase (20 µg/mL). O DNA foi armazenado em temperatura de -20°C.

Alíquotas do DNA de cada amostra foram utilizadas para uma estimativa visual da quantidade de DNA, em gel de agarose 0,8% corados com brometo de etídio (20 µg/100 mL), por comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago λ. A imagem foi capturada por sistema de EDAS 290 (*Kodak 1D Image Analysis 3.5*).

2.4. DNA mitocondrial e amplificação via PCR

Fragmentos do genoma mitocondrial foram amplificados via PCR, a partir de amostras de DNA total. As condições de amplificação foram baseadas em Prioli et al. (2002). Três segmentos do DNA mitocondrial foram utilizados: região controle do *D-loop* e os genes citocromo b (*cytb*) e citocromo c oxidase subunidade I (*coxI*). Para cada região, foram empregados primers (oligonucleotídeos iniciadores) específicos (Quadro 3).

Quadro 3 - Primers utilizados para amplificação das regiões *D-loop*, *cytb* e *coxI* do DNA mitocondrial (mtDNA) e suas respectivas sequências nucleotídicas

Primer	Região do mtDNA	Sequência nucleotídica	Ref.
L D-loop M	<i>D-loop</i>	5' -WAAGCRTCGGTCTTGTAAWCC-3'	1
H16498	<i>D-loop/Cytb</i>	5' -CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3'	2
L14841	<i>Cytb</i>	5' -CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	3
H7152	<i>CoxI</i>	5' -CACCTCAGGGTGTCCGAARAAycARAA-3'	4
L6448-F1	<i>CoxI</i>	5' -TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	5

1. Presente estudo; 2. Meyer et al., 1990; 3. Kocher et al., 1989; 4. Ivanova et al., 2007; 5. Ward et al., 2005.

O par de primers H16498 x L14841 foi utilizado para amplificação tanto da região *D-loop* quanto do gene *cytb*. Esse par de primers amplifica um segmento de quase 1.700 pares de base (pb) que compreende parte do gene *cytb*, parte da região controle do *D-loop* e as sequências completas dos genes tRNA^{Thr} e tRNA^{Pro}, que codificam os tRNAs dos aminoácidos treonina e prolina, respectivamente. Porém, não foi possível a amplificação via PCR de alguns exemplares de *S. maculatus* com esse conjunto de primers. Nesse caso, foi utilizado um segundo par de primers (H16498 x L

D-loop M), que produziu um fragmento com cerca de 550 a 650 pb, dependendo do local de coleta do espécime. Esse fragmento corresponde à extremidade 3' do gene citocromo b, às seqüências completas dos genes tRNA^{Thr} e tRNA^{Pro}, e um segmento da região variável do *D-loop*. Finalmente, os primers H7152 x L6448-F1 foram utilizados para amplificação de uma seqüência parcial do gene *coxI*, com cerca de 700 pb.

Os fragmentos foram amplificados em reações independentes de PCR para depois serem seqüenciados e analisados. O volume final da reação foi de 25 µL, constituído de Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µM de cada primer, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, 15 ng de DNA e água deionizada e filtrada em equipamento Milli-Q para completar o volume para 25 µL. As amplificações dos fragmentos foram executadas em termociclador programado para diferentes perfis de temperatura, dependendo do primer utilizado. O seguinte perfil térmico foi usado para amplificação das regiões *D-loop* e *cytb*: um ciclo inicial de 4 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 59-61 °C e 2 minutos a 72 °C, além de um último ciclo de 10 minutos a 72 °C. Para a região *coxI*, foram utilizados um ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 40 segundos a 52-55 °C e 1 minuto a 72 °C, além de uma etapa final de 10 minutos a 72 °C.

A eficiência da amplificação foi confirmada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL) e os tamanhos dos fragmentos amplificados foram determinados por comparação com o padrão molecular *Ladder* 100 pb (Invitrogen). Posteriormente, as amostras foram purificadas com polietilenoglicol (PEG) para eliminação do excesso de primers e de resíduos de nucleotídeos, segundo protocolo de Rosenthal et al. (1993).

2.5. Sequenciamento

Os fragmentos obtidos foram novamente amplificados unidirecionalmente com os primers H16498 ou L D-loop M, para a região controle do *D-loop*, L14841, para a região do *cytb*, e L6448-F1 para a região do *coxI*. Cerca de 50 ng de DNA do produto final de cada reação de PCR foram usados diretamente em reações de

seqüenciamento com *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* em um seqüenciador automático *MegaBace* (Amersham), segundo instruções do fabricante.

2.6. Verificação de saturação

Saturação de substituições em sequências de DNA ocorre devido a múltiplas substituições em um mesmo sítio nucleotídico. Isso pode levar à subestimação do número de substituições e, assim, afetar as análises de reconstrução filogenética. O nível de saturação das substituições foi avaliado graficamente pela plotagem do número de transições e tranversões versus a divergência das sequências analisadas por meio do programa *DAMBE* (Xia e Xie, 2001). Além disso, o teste de saturação das substituições baseado na estatística I_{ss} , proposto por Xia et al. (2003) e conduzido no programa *DAMBE*, foi realizado separadamente para cada região do DNA mitocondrial analisada no presente estudo.

2.7. Análises filogenéticas

Todas as seqüências nucleotídicas, sob o formato de cromatograma, foram alinhadas utilizando-se o programa *Clustal W* (Thompson et al., 1994) e editadas manualmente com *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1* (Hall, 1999). O número de nucleotídeos polimórficos, as distâncias p (porcentagem de diferenças nucleotídicas), as freqüências de bases nucleotídicas e números de transições e tranversões entre os indivíduos foram calculados com o programa *Mega 4.0 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Tamura et al., 2007). A tradução das seqüências dos genes mitocondriais *cytb* e *coxI* em aminoácidos também foi realizada no *Mega 4.0*. As diversidades haplotípicas (h ; Nei, 1987) e nucleotídicas (π ; Nei, 1987) foram calculadas pelo programa *DNA_{sp} 5.10* (Librado e Rozas, 2009).

As análises filogenéticas foram processadas por comparações entre indivíduos tomados dois a dois. Admitindo-se que o significado evolutivo das deleções em seqüências do DNA não é bem conhecido (Nei e Kumar, 2000), não foram incluídas nas análises os sítios com deleção em cada uma das comparações.

Com os programas *Modeltest 3.7* (Posada e Crandal, 1998) e *PAUP 4.0 beta 10 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)* (Swofford, 2002), foram selecionados os

modelos evolutivos apenas para as sequências dos genes *cytb* e *coxI*, utilizando-se os procedimentos *Corrected Akaike Information Criterion* (AICc) e *Bayesian Information Criterion* (BIC), modelo escolhido, por máxima verossimilhança, como o melhor para o ajuste dos dados de ambas as regiões *cytb* e *coxI* foi HKY + G. Para o fragmento *D-loop*, a etapa de seleção do modelo foi desconsiderada. Como a região apresentou vários *indels* (inserções ou deleções) no alinhamento, esses segmentos seriam descartados nas análises conduzidas pelo programa *PAUP 4.0 beta 10*, conforme descrito anteriormente. Assim, as análises para a região do *D-loop* foram baseadas apenas na distância p, comparando-se indivíduos tomados dois a dois, sob a opção de *pairwise deletion* disponível apenas no programa *Mega 4.0*. Dessa maneira, as informações contidas nas regiões com *indels* não foram totalmente excluídas.

As análises filogenéticas foram baseadas no algoritmo *neighbor-joining* (“união-de-vizinhos”; NJ), o qual estima as relações genealógicas pela minimização das distâncias entre os táxons e dentro da árvore, gerando, assim, um índice de semelhança. A construção das árvores *neighbor-joining* baseadas nas sequências dos genes *cytb* e *coxI* foi realizada por meio do programa *PAUP 4.0 beta 10* (Swofford, 2002), usando-se, para isso, o modelo de substituição nucleotídica sugerido pelo *Modeltest 3.7* (Posada e Crandal, 1998). As matrizes de distância p, geradas pelo *Mega 4.0*, para as três regiões do genoma mitocondrial, também foram utilizadas para o agrupamento com o algoritmo *neighbor-joining*. Análises de *bootstrap* basearam-se em 10.000 reamostragens. Foram retidos os valores de *bootstrap* com frequência maior que 50%, os quais foram utilizados para avaliar o suporte para clados individuais dentro de cada árvore. As árvores foram enraizadas pelo critério de grupos externos (*outgroups*), usando-se *Pygopristis denticulatus* (no caso do *D-loop*) e *Piaractus brachypomus* (para *cytb* e *coxI*) (Quadro 2), por estes terem sido colocados como táxons próximos ao gênero *Serrasalmus* nos estudos de Ortí et al. (2008) e Calcagnotto et al. (2005), respectivamente.

A matriz de distância gerada pelo programa *Mega 4.0* a partir das sequências nucleotídicas dos exemplares foi empregada na obtenção dos autovetores pelo programa *DistPCoA* (Legendre e Anderson, 1998). Em seguida, um gráfico de dispersão em coordenadas principais foi confeccionado, após correção das distâncias,

proposta por Lingoês (Legendre e Anderson, 1998), utilizando-se os dois primeiros autovetores por meio do programa *STATISTICA 6.0* (StatSoft, Inc., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*)

Para a região do *D-loop*, foram analisados três espécimes de *Serrasalmus maculatus* da planície de inundação do alto rio Paraná, dez do rio Manso e outros dez da bacia do rio Tocantins, além de cinco indivíduos de *Serrasalmus* sp., também do rio Tocantins. Dependendo do conjunto de primers utilizado para amplificação do *D-loop*, fragmentos de tamanhos diferentes foram obtidos. O primeiro, amplificado com os primers H16498 e L14841, produziu um fragmento de aproximadamente 1.700 pb, enquanto a amplificação do DNA com os primers H16498 e L D-loop M originou fragmentos que variaram entre 550 e 650 pb. No último caso, a variação no tamanho dos fragmentos foi em função do local de coleta dos espécimes. A população do rio Tocantins apresentou os menores fragmentos (550 pb), enquanto os indivíduos da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai produziram segmentos em torno de 580 a 650 pb.

Após seqüenciamento e edição manual, duas seqüências menores foram obtidas: uma correspondente aos genes do tRNA^{Pro} e parte do tRNA^{Thr}, e outra compreendendo a porção hipervariável da região controle do *D-loop*. Essas seqüências foram escolhidas por conterem melhor qualidade e confiabilidade de seqüenciamento. Os tRNAs, com 105 pb, foram identificados com o programa *tRNAscan-SE 1.21* (Lowe e Eddy, 1997) e, após alinhamento, revelou apenas um ponto de substituição nucleotídica, o qual foi exclusivo das populações de *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* da bacia do rio Tocantins.

As seqüências nucleotídicas da porção hipervariável do *D-loop* (de tamanhos variando entre 369 e 414 pb, dependendo da amostra) foram confirmadas, por similaridade, com acessos disponíveis no *GenBank*. Considerando apenas as populações de *Serrasalmus maculatus* e *Serrasalmus* sp. analisadas no presente estudo, foi possível identificar vários *indels* (inserções ou deleções), além de 62 sítios variáveis, sendo 47 deles parcimoniosamente informativos. As freqüências nucleotídicas dessa região foram A=34,5%, T=26,3%, C=25% e G=14,2%, revelando maior proporção de nucleotídeos A/T. Essa tendência está de acordo com o esperado para esse segmento do DNA mitocondrial em vertebrados (Brown et al., 1986). As

taxas da razão transição/transversão para as populações de *S. maculatus* foram de $k_1 = 24,511$ (purinas) e $k_2 = 11,528$ (pirimidinas), sendo transição o tipo de substituição mais freqüente ($R = si/sv = 5,878$). A maior taxa de transição concorda com o esperado para o fragmento *D-loop* (Nei e Kumar, 2000).

O teste de saturação revelou que o I_{ss} , ou índice de saturação de substituição observado (0,355 e 0,757), foi significativamente menor que $I_{ss,c}$, ou índice de saturação de substituição crítico (0,792 e 12,120, para topologias simétricas e assimétricas, respectivamente). Além disso, a plotagem no gráfico do número de transições (s) e transversões (v) versus a divergência das sequências analisadas evidenciou uma correlação quase linear (Figura 2). Portanto, há pouca saturação de substituições nucleotídicas nas sequências obtidas no presente estudo.

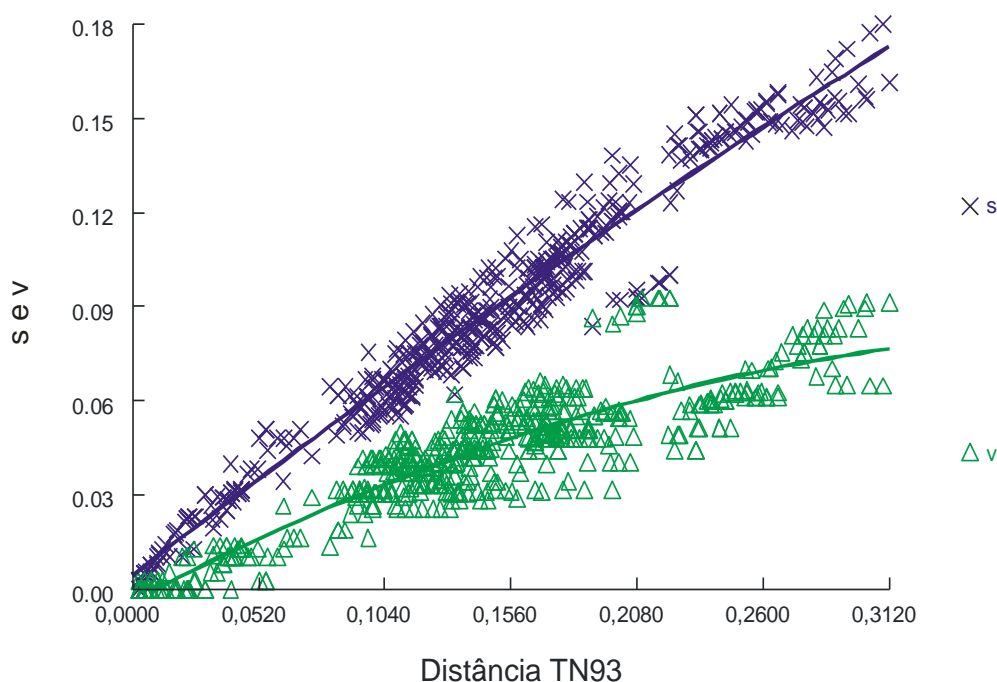


Figura 2 - Gráfico de transição (s) e transversão (v) versus distância de Tamura e Nei (1993) de sequências da região controle do *D-loop* em *Serrasalmus maculatus* e *Serrasalmus* sp., sem o *outgroup*.

Por meio do alinhamento *Clustal W* das sequências do *D-loop*, foi possível a identificação de 14 haplótipos de *Serrasalmus maculatus* das bacias do alto rio Paraná, rio Manso e rio Tocantins. Inclusive, pode-se observar que os indivíduos de *Serrasalmus* sp. provenientes do rio Tocantins apresentaram exatamente os mesmos haplótipos de *S. maculatus* coletados nessa mesma bacia hidrográfica (Quadro 4).

Quadro 4 - Polimorfismo nucleotídico das sequências da região controle (*D-loop*) do DNA mitocondrial (369-414 pb) de populações de *Serrasalmus maculatus* das bacias do alto rio Paraná (SmcLG e SmcRB), rio Manso (SmcMS) e rio Tocantins (SmcTO) e de *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins (SrsTO). Pontos representam similaridade entre as sequências e traços correspondem a deleções identificadas em algumas amostras

64

Espécie	Amostras	Haplótipos	11111111112222222222333344444555556666677777777777888888888899999999990001116890012233355666778222346669 12345678901234567890123456789023512345756789127890123456789012345678901234567890271590056795603505016679246713457
<i>S. maculatus</i>	SmcTO65, 69, 70, 73, 74, 79, 80, 82	Smc-I	-----CCCGGTT--GTT---TATCACACCCGCA-----TGATGGCCT-GGC-ATCACAGACTAGCTTCGCGACTCTCTT-T
<i>S. maculatus</i>	SmcTO66	Smc-II	-----C-----G-----C-----
<i>S. maculatus</i>	SmcTO78	Smc-III	-----A-----
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO38, 57	Srs-I	-----A-----
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO56, 60	Srs-II	-----
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO59	Srs-III	-----C-----G-----C-----
<i>S. maculatus</i>	SmcMS51	Smc-IV	CCCTCGCCCGCCTCACATATTAC---ACAGGACA.GGA.GGCACC.GG.....A.....GC.....GC-.T.T.AGT.CATCCTAT..TCTC..AA.
<i>S. maculatus</i>	SmcMS52, 56, 57	Smc-V	CCCTCGCCCGCCTCACATCTTAC---ACAGGACA.GGA.GGCACC.GG.....A.....GC.....GC-.T.T.AGT.CATCCTAT..TCTC..AA.
<i>S. maculatus</i>	SmcMS53	Smc-VI	CCCTCGCCCGCCTCACATCTTAC---ACAGGACA.GGA.GGCACC.GG.....A.TGGCACCCACAC.GC.....GC..T.T.AG..CATCCTAT..TCTC..AA.
<i>S. maculatus</i>	SmcMS55	Smc-VII	CCCTCGCCCGCCTCACATCTTAC---ACAGGACACGGACGGCACC CGG.....A..CGGCACCCACAC.GC.....GC..TGT.....CATCCT.T..TCTC..AA.
<i>S. maculatus</i>	SmcMS58	Smc-VIII	CCCTCGCCCGCCTCACATCTTAC---ACAGGACA.GGA.GGCACC.GG.....A.....GC.....GC..T.T..G..CATCCTAT..TCTC..AA.
<i>S. maculatus</i>	SmcMS61	Smc-IX	CCCTCGCCCGCCTCACATCTTAC---ACAGGACA.GGA.GGCACC.GG.....A.TGGCACCCACAC.GC.....GC-.T.TGAGT.CATCCTAT..T.TC..AA.
<i>S. maculatus</i>	SmcMS68	Smc-X	CCCTCGCCCGCCTCACATCTTAC---ACAGGACA.GGA.GGCACC.GG.....A.TGGCACCCACAC.GC.....GC..T.T.....CATCCTAT..TCTC..AA.
<i>S. maculatus</i>	SmcMS69	Smc-XI	CCCTCGCCCGCCTCACATCTTAC---ACAGGACA.GGA.GGCACC-----GC.....GC-.T.T.AGT.CATCCTAT..TCTC..AA.
<i>S. maculatus</i>	SmcLG12	Smc-XII	CCCTCGCCCGCCTCACATGGCGCCACAGG.CA.GG..GGCGCC.GG.G...A.....GC.C..CACC GC..T.T.A...TAT.CTAT..TCT.T.AA.
<i>S. maculatus</i>	SmcRB04	Smc-XIII	CCCTCGCCCGCCTCACATGGCGCCACAGG.CA.GG..GGCGCC.GG.G...A.....GC.C..CACC GC.CT.T.A...TAT.CTAT..TCTC..AAC
<i>S. maculatus</i>	SmcRB08	Smc-XIV	CCCTCGCCCGCCTCACATGGCGCCACAGG.CA.GG..GGCGCC.GG.G...A.C-----CCGC..T.T.A...TAT.CTATA.TCTCT.AA.

Foram detectadas 42 substituições nucleotídicas nas sequências do *D-loop* das populações analisadas, além de várias regiões com *indels*. A maioria das substituições e dos *indels* foi associado a uma determinada região de coleta dos espécimes de *S. maculatus*. Dessas substituições, 20 foram exclusivas das populações de *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus*, ambos da bacia do rio Tocantins, enquanto três foram associadas à população do alto rio Paraná e outras três, à população do rio Manso. As demais substituições não caracterizaram nenhuma localidade. Além disso, quando foram consideradas apenas as populações da bacia do rio Paraná-Paraguai, vários polimorfismos nucleotídicos também permitiram a diferenciação dessas populações: nove sítios estavam presentes exclusivamente em *S. maculatus* do rio Manso (bacia do rio Paraguai) enquanto onze sítios ocorreram apenas na população do alto rio Paraná.

O final da região controle do DNA mitocondrial, *D-loop* (extremidade 5' da fita H), próximo ao gene do tRNA^{Pro}, revelou algumas repetições em tandem apenas nos espécimes de *S. maculatus* da bacia do rio Paraná-Paraguai. Ou seja, a presença ou ausência dessas regiões repetitivas no *D-loop* permitiu a caracterização das populações das bacias do rio Paraná-Paraguai e do rio Tocantins, respectivamente. Os motivos repetitivos apresentaram 12 pb de tamanho e repetiram-se por até cinco vezes, representando parte da variação no comprimento dos fragmentos amplificados (Quadro 5).

Quadro 5 - Repetições em tandem da região controle do *D-loop* de populações de *Serrasalmus maculatus* da bacia do alto rio Paraná (SmcLG e SmcRB) e alto rio Paraguai (SmcMS)

Amostra	Motivo repetitivo	Número de repetições	Comprimento da região de repetição em tandem
SmcMS51, 52, 56, 57, 58	GGCACCCACAT	4	48 pb
SmcMS53, 61, 68	GGCACCCACAT	5	60 pb
SmcMS55	GGCACCCACAC	5	60 pb
SmcMS69	GGCACCCACAT	3	36 pb
SmcLG12, SmcRB04	GGCGCCACAT	5	60 pb
SmcRB08	GGCGCCACAT	4	48 pb

A análise de diversidade genética a partir das sequências do *D-loop* demonstrou que *S. maculatus* do alto rio Paraná apresentou os maiores valores de diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica e de distância genética p . No entanto, a população do rio Manso foi a que apresentou o maior número de haplótipos (Quadro 6).

Quadro 6 - Diversidades haplotípicas e nucleotídicas obtidas a partir da região do *D-loop* de populações de *Serrasalmus maculatus* (Smc) e de *Serrasalmus* sp. (Srs) do rio Tocantins (TO), rio Manso (MS) e do alto rio Paraná (PR). n = número de sequências; NH = número de haplótipos; h = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, p = distância p

Espécies/ Populações	n	NH	h	π	p
SmcTO	10	3	0,38	0,0027	0,3
SmcMS	10	8	0,94	0,0076	0,8
SmcPR	3	3	1,00	0,0118	1,2
SrsTO	5	3	0,80	0,0059	0,6

Os valores de distância genética p , em porcentagem, entre as populações de *Serrasalmus maculatus* das diferentes bacias hidrográficas podem ser visualizadas no Quadro 7.

Quadro 7 - Valores médios de distância p , em porcentagem, entre (abaixo da diagonal) e dentro (diagonal) de populações de *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins (SmcTO), rio Manso (SmcMS), alto rio Paraná (SmcPR) e rio Uruguai (SmcUR; *GenBank*), além de *Serrasalmus* sp., do rio Tocantins (SrsTO), obtidos a partir de sequências da região controle do *D-loop*

Espécies/ Populações	SmcTO	SmcMS	SmcPR	SmcUR	SrsTO
SmcTO	0,3				
SmcMS	8,8	0,8			
SmcPR	9,5	4,2	1,2		
SmcUR	8,8	2,5	2,2	-	
SrsTO	0,4	8,7	9,6	8,9	0,6

A diferenciação genética entre os indivíduos da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai (SmcPR x SmcMS) atingiu valor de 4,2% (Quadro 7). Esse valor foi menor que a metade daquele observado entre os espécimes da bacia do rio Paraná-Paraguai e do rio Tocantins (SmcPR x SmcTO e SmcMS x SmcTO). As populações do rio Manso e do rio Paraná diferenciaram-se da população do rio Tocantins por 8,8% e 9,5%, respectivamente. Valores de diferenciação genética dessa magnitude também foram detectados entre diferentes espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, como observado no Quadro 8.

Quadro 8 - Valores médios de distância p, em porcentagem, entre (abaixo da diagonal) e dentro (diagonal) de espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, baseados na região controle do *D-loop*. Ntr = *P. nattereri*, rio Tocantins, rio Manso e GenBank (Gb); Crb = *P. cariba*, Gb; Mgn = *S. marginatus*, alto rio Paraná; Gb; Smc = *S. maculatus*, rio Uruguai; Egm = *S. eigenmanni*, Gb; Rmb = *S. rhombeus*, Gb; Gou = *S. gouldingi*, Gb; Man = *S. manuei*, Gb; Med = *S. medinai*, Gb; Ser = *S. serrulatus*, Gb; Irr = *S. irritans*, Gb; Ssp = *Serrasalmus* sp.

Espécie	Ntr	Crb	Mgn	Smc	Egm	Rmb	Gou	Man	Med	Ser	Irr	Ssp
Ntr	2,4											
Crb	10,9	1,1										
Mgn	9,9	12,4	0,5									
Smc	12,4	15,3	15,2	-								
Egm	12,0	13,2	10,1	15,4	-							
Rmb	10,8	14,2	6,2	18,0	11,5	-						
Gou	11,1	12,3	9,6	15,1	7,1	11,1	5,1					
Man	18,0	20,5	20,9	23,4	20,2	21,6	20,9	2,1				
Med	15,6	16,0	16,2	19,2	14,0	17,5	15,5	18,9	-			
Ser	11,6	13,0	10,2	16,1	6,3	11,3	6,1	21,9	15,6	-		
Irr	10,4	13,3	13,3	16,0	12,4	15,2	11,0	14,3	14,7	12,2	-	
Ssp	11,2	12,6	8,8	15,4	5,2	9,9	5,6	21,2	15,9	4,7	11,8	-

Foram realizadas também análises de distância genética baseadas na região controle do *D-loop* para outras espécies de Characiformes, cujas sequências estão disponíveis no GenBank (Anexo 2; resultados não mostrados). Para isso, foi

selecionado exatamente o mesmo segmento usado nas análises anteriores de *Serrasalmus maculatus*. Por comparação dos valores obtidos, as diferenças de *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins e da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai (8,8 e 9,5%) mantiveram-se nos mesmos patamares das diferenciações encontradas entre espécies diferentes de outros gêneros de caraciformes. A maioria das relações entre as espécies do gênero *Prochilodus* apresentou valores de distâncias p em torno de 5,0% e 9,0%. Valores menores do que aqueles detectados entre *Serrasalmus maculatus* da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai e do rio Tocantins também foram encontrados entre espécies diferentes dos gêneros *Piaractus* (2,9%) e *Mylossoma* (4,7%).

Dentro de cada população, os valores de distância p variaram de 0,3% para *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins até 1,2% para *Serrasalmus maculatus* do alto rio Paraná. O valor médio de distância p detectado entre *Serrasalmus* sp. e a população de *S. maculatus* do rio Tocantins foi mínimo (apenas 0,4%), não permitindo a distinção de *Serrasalmus* sp. e *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins (Quadro 7).

A partir do dendrograma *neighbor-joining* construído com os valores de distância p para a região do *D-loop* (Figura 3), observou-se a separação dos haplogrupos de *Serrasalmus maculatus*. Além disso, as outras espécies dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* foram incluídas nessa análise para facilitar as comparações. O agrupamento dos espécimes de *Serrasalmus maculatus* de acordo com suas localidades foi apoiado por altos valores de *bootstrap*. É evidente a diferenciação entre os haplogrupos de *Serrasalmus maculatus* da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai e do rio Tocantins. Essa diferenciação foi, inclusive, algumas vezes maior que entre as espécies do grupo externo. Espécimes de *Serrasalmus* sp. agruparam-se com *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins, não havendo diferenciação entre essas espécies.

A diferenciação genética de *Serrasalmus maculatus*, bem como a separação entre os haplogrupos de acordo com as suas distribuições geográficas, observadas nas análises anteriores, foram corroboradas pela construção do gráfico de dispersão em coordenadas principais (Figura 4) baseado nas distâncias p não corrigidas das sequências do *D-loop*.

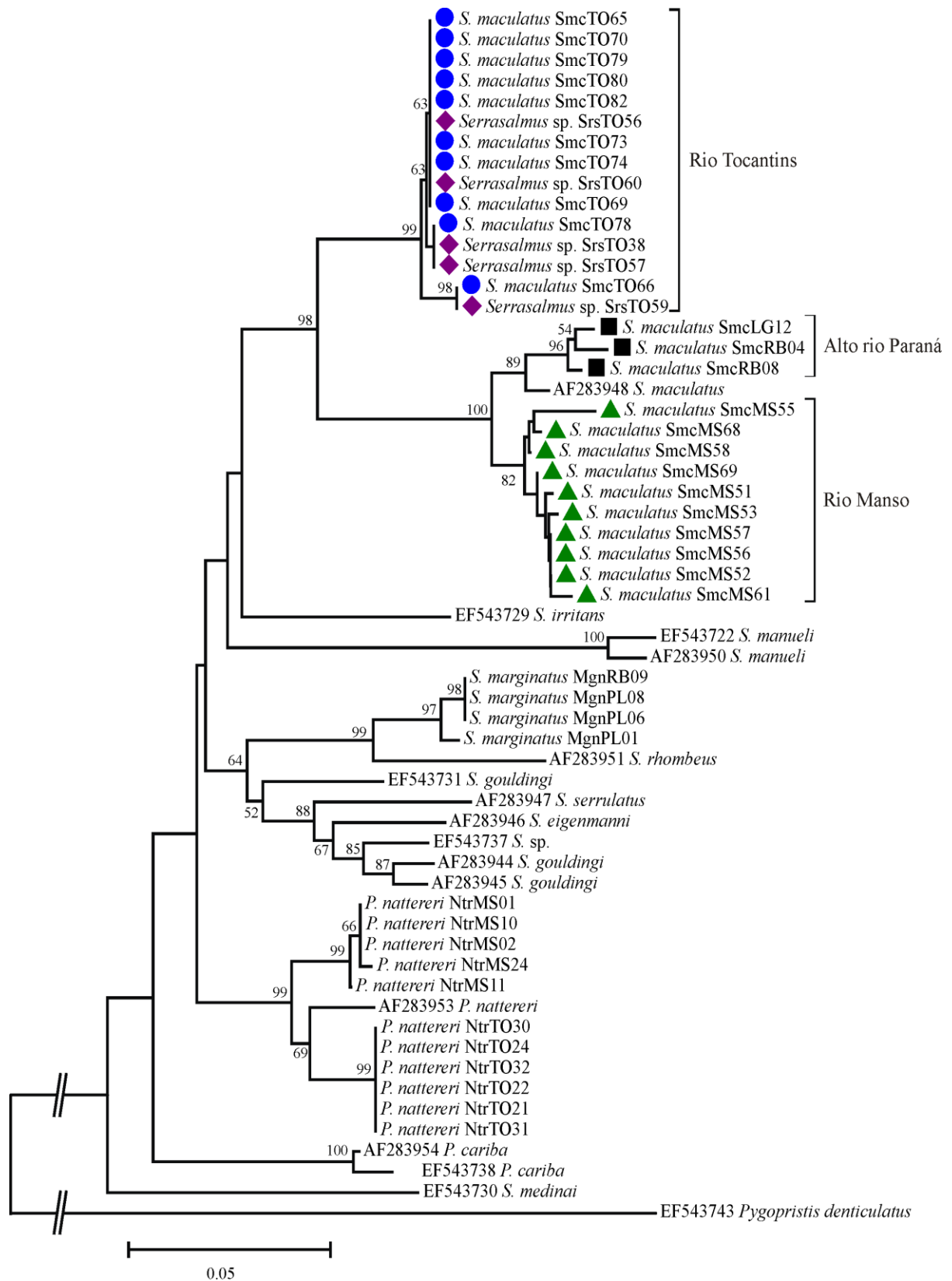


Figura 3 - Dendrograma *neighbor-joining* das distâncias p da região *D-loop* dos espécimes de *Serrasalmus* sp. e de *S. maculatus* coletados nas bacias do rio Tocantins, alto rio Paraná e rio Manso, além de outras espécies dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Números nas ramificações da árvore representam valores de *bootstrap* baseados em 10.000 reamostragens.

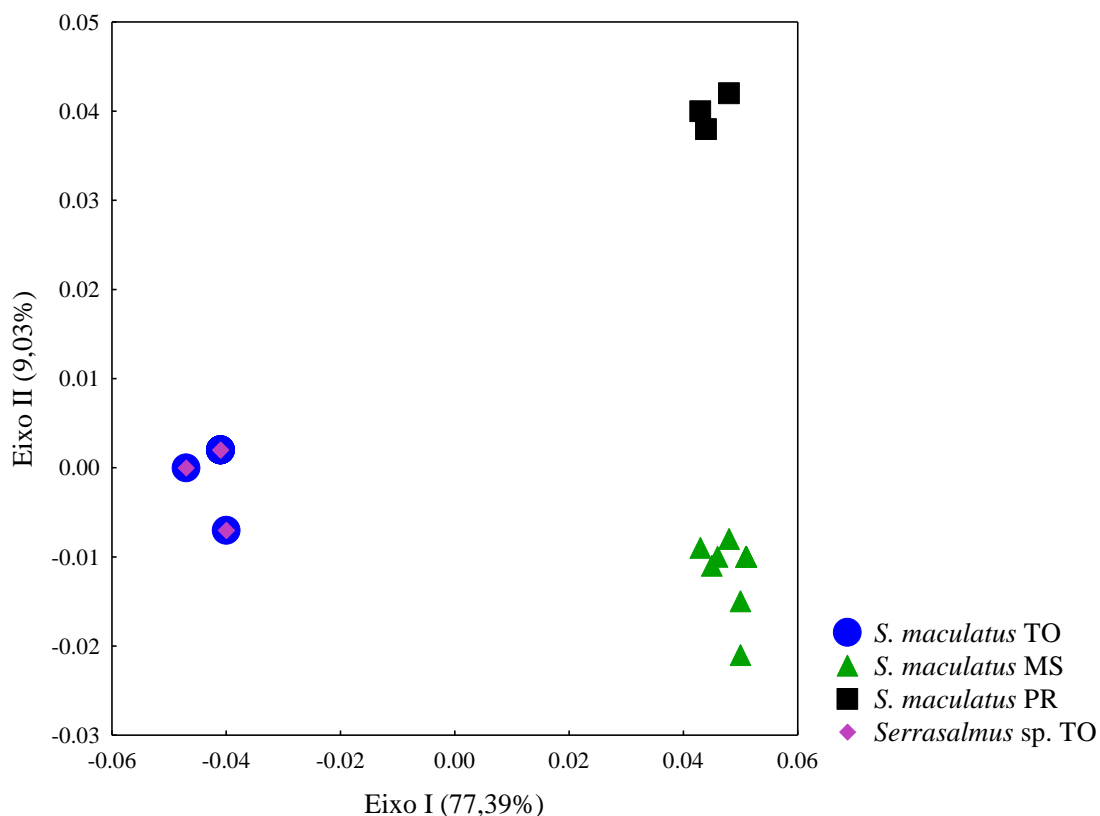


Figura 4 - Gráfico de dispersão nos dois primeiros eixos da análise de coordenadas principais de populações de *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins (TO), rio Manso (MS) e alto rio Paraná (PR), além de exemplares de *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins, baseado nos autovetores calculados a partir da distância p de seqüências da região controle do *D-loop*.

3.2. Gene mitocondrial citocromo b (*Cytb*)

Foi amplificado e seqüenciado um segmento parcial do gene *cytb* de dez espécimes de *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins, nove do rio Manso e quatorze do alto rio Paraná. Também foram incluídas nas análises sete amostras de *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins. A amplificação via PCR gerou um fragmento de aproximadamente 1.700 pb. Esse fragmento continha, além de um segmento parcial do gene *cytb*, parte do *D-loop* e as seqüências completas dos genes tRNA^{Thr} e tRNA^{Pro}. Após seqüenciamento e edição manual, uma região menor, de 592 pb, foi selecionada para as análises. Essa região apresentou melhor qualidade e confiabilidade de seqüenciamento, além de conter apenas a seqüência referente ao gene *cytb*. As seqüências foram confirmadas, por similaridade, com acessos disponíveis no *GenBank*.

As seqüências do gene *cytb* das populações de *S. maculatus* e de *Serrasalmus* sp. apresentaram freqüências de A = 24,9%, T = 25,7%, C = 33,4% e G = 16% na fita codante, evidenciando tendência antiguanina, característica dessa região do genoma mitocondrial (Cantatore et al., 1994). A taxa de transição/transversão foi de $R = si/sv = 1,625$, com taxas de transição/transversão $k_1 = 2,112$ (purinas) e $k_2 = 3,81$ (pirimidinas). Foram identificados 28 sítios variáveis, sendo 26 deles parcimoniosamente informativos.

O teste de saturação conduzido no programa *DAMBE* revelou que as seqüências do gene *cytb* estavam pouco saturadas. Esse fato pode ser visualizado na Figura 5, onde se observa uma correlação praticamente linear entre transições (s) e transversões (v) versus a divergência das seqüências analisadas, baseadas na distância de Tamura e Nei (1993). Análises do índice de saturação de substituição indicaram que o valor de I_{ss} (0,05) foi significativamente menor do que $I_{ss,c}$ (0,723 e 0,4898, para topologias simétricas e assimétricas, respectivamente).

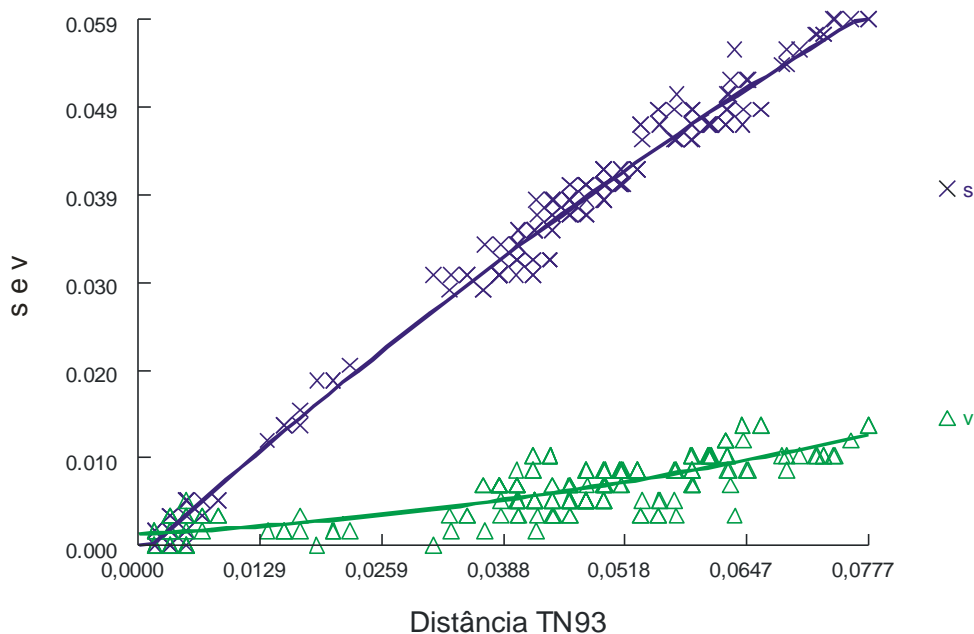


Figura 5 - Gráfico de transição (s) e transversão (v) versus distância de Tamura e Nei (1993) de seqüências do gene mitocondrial citocromo b em *Serrasalmus maculatus* e *Serrasalmus* sp., sem o *outgroup*.

Regiões codificadoras como o gene *cytb* são geralmente mais conservadas do que o *D-loop* e, portanto, apresentam menos diferenças entre táxons próximos. Isso

pode ser observado por meio do alinhamento *Clustal W* realizado com as sequências do gene *cytb* das populações de *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* (Quadro 9). Vinte e oito polimorfismos nucleotídicos e dez haplótipos foram identificados entre as populações analisadas, de maneira que um haplótipo encontrado para *Serrasalmus* sp. (presente na maioria dos espécimes) foi idêntico ao haplótipo de *S. maculatus* do rio Tocantins. As populações de *S. maculatus* da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai diferiram da encontrada no rio Tocantins por 20 substituições nucleotídicas. Ainda, os espécimes de *S. maculatus* coletados na planície do alto rio Paraná apresentaram um polimorfismo nucleotídico exclusivo dessa população. As demais substituições não caracterizaram nenhuma bacia hidrográfica.

Quadro 9 - Polimorfismo nucleotídico das sequências do gene mitocondrial citocromo b (*Cytb*; 592 pb) de populações de *Serrasalmus maculatus* das bacias do alto rio Paraná (SmcPL, SmcLG e SmcRB), rio Manso (SmcMS) e rio Tocantins (SmcTO) e de *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins (SrsTO)

Espécie	Amostras	Haplótipos	11112223333344444445555 1457233727803368912445590039 8845028483203991979242951471
<i>S. maculatus</i>	SmcTO65,66,69,70,73,74, 79-82	Smc-I	ATCCAACACCGCACGCACTGCCCAACC
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO38,56,57,60-62	Srs-I
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO59	Srs-IIA.....
<i>S. maculatus</i>	SmcMS51,52,61	Smc-II	GC..GGAGTTATCTATTTTCAT.T..T.T
<i>S. maculatus</i>	SmcMS53,55,58,66,68	Smc-III	GCT.GGA.TTATCTATTTTCAT.T..T.T
<i>S. maculatus</i>	SmcMS69	Smc-IV	GC.TGGAGTTATCTATTTTCAT.T..T.T
<i>S. maculatus</i>	SmcLG01	Smc-V	GC..GGAGTTATCTATTTTCAT.TAGT.T
<i>S. maculatus</i>	SmcLG05,06,11,12, RB01,08, PL04,10-12,15	Smc-VI	GC..GGAGTTATCTATTTTCAT.T.GT.T
<i>S. maculatus</i>	SmcRB04	Smc-VII	GC..GGAGTTATCTATTTTCAT.TAGTAT
<i>S. maculatus</i>	SmcRB07	Smc-VIII	GC..GGAGTTATCTATTTTCATAT.GTAT

O Quadro 10 apresenta as diversidades haplotípicas e nucleotídicas das populações de *Serrasalmus maculatus* e de *Serrasalmus* sp. das três bacias hidrográficas analisadas. A maior diversidade haplotípica e nucleotídica baseada no gene citocromo b foi encontrada na população de *S. maculatus* do rio Manso. No entanto, a população do alto rio Paraná apresentou o maior número de haplótipos. Já *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins teve diversidades haplotípica e nucleotídica nulas.

Quadro 10 - Diversidades haplotípicas e nucleotídicas obtidas a partir das sequências do gene mitocondrial citocromo b de populações de *Serrasalmus maculatus* (Smc) e de *Serrasalmus* sp. (Srs) do rio Tocantins (TO), rio Manso (MS) e do alto rio Paraná (PR). n = número de sequências; NH = número de haplótipos; h = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, p = distância p

Espécies/ Populações	n	NH	h	π	p
SmcTO	10	1	0,00	0,0000	0,0
SmcMS	9	3	0,64	0,0023	0,2
SmcPR	14	4	0,40	0,0011	0,1
SrsTO	8	2	0,29	0,0005	0,0

A sequência parcial do gene *cytb* (592 pb) correspondeu a 197 aminoácidos. Foram encontrados quatro polimorfismos aminoacídicos, sendo que um estava associado aos indivíduos de *S. maculatus* da bacia do rio Paraná-Paraguai. Os demais estavam distribuídos entre espécimes isolados do alto rio Paraná, não caracterizando nenhuma região.

O quadro 11 mostra os valores de distância p entre as populações de *Serrasalmus maculatus* e *Serrasalmus* sp., além de outras espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Dentro de cada população de *S. maculatus* e de *Serrasalmus* sp., valores baixos de distância p foram detectados (máximo de 0,2%) em função dos poucos polimorfismos nucleotídicos que ocorrem nas sequências do gene *cytb*. Além disso, uma vez que *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* do rio Tocantins apresentaram mesma sequência nucleotídica, foi detectado valor nulo de distância p entre essas espécies.

Entretanto, nas comparações entre populações de bacias hidrográficas distintas, valores maiores foram detectados. Novamente, as populações de *S. maculatus* do alto rio Paraná e do rio Manso divergiram da população do rio Tocantins por valor relativamente alto de distância p. Enquanto *S. maculatus* do alto rio Paraná diferenciou-se de *S. maculatus* do rio Manso por valor de distância genética p de apenas 0,4%, essas mesmas populações diferenciaram-se da população do rio Tocantins por valores de 3,7% e 3,8%, respectivamente. Valores dessa magnitude

foram encontrados entre diferentes espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Quadro 11). Esses valores são também maiores do que aqueles identificados entre algumas espécies de Characiformes dos gêneros *Brycinus* (2,8%), *Alestopetersius* (3,7%), e *Hydrocynus* (0,7%) (Anexo 2; dados não mostrados).

Quadro 11 - Valores médios de distância p, em porcentagem, entre (abaixo da diagonal) e dentro (diagonal) de populações de *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins (SmcTO), rio Manso (SmcMS) e alto rio Paraná (SmcPR), além de *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins (SrsTO), e outras espécies de piranhas, obtidos a partir de seqüências do gene mitocondrial citocromo b. Ntr = *P. nattereri*, rio Tocantins e rio Manso; Pry = *P. piraya*, rio São Francisco; Mgn = *S. marginatus*, bacia hidrográfica Paraná-Paraguai; Rmb = *S. rhombeus*, rio Tocantins; Egm = *S. eigenmanni*, rio Tocantins; Bdt = *S. brandtii*, rio São Francisco

Espécie	Smc TO	Smc MS	Smc PR	Srs TO	Mgn	Rmb	Egm	Bdt	Ntr	Pry
SmcTO	0,0									
SmcMS	3,7	0,2								
SmcPR	3,9	0,4	0,1							
SrsTO	0,0	3,7	3,9	0,0						
Mgn	4,0	4,5	4,7	4,0	0,5					
Rmb	4,1	4,7	4,9	4,0	1,8	1,9				
Egm	4,4	4,1	4,3	4,4	3,3	3,6	-			
Bdt	3,9	3,7	3,9	3,9	5,2	5,7	4,4	-		
Ntr	6,2	6,2	6,4	6,1	5,4	5,2	5,3	6,6	3,0	
Pry	5,7	5,6	5,8	5,7	4,5	4,3	4,7	6,6	2,6	0,3

A Figura 6 apresenta o dendrograma *neighbor-joining* construído com base nos valores de distância p do gene mitocondrial *cytb* dos espécimes de *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* das bacias dos rios Paraná-Paraguai e Tocantins, além dos grupos de comparação. A divergência genética entre os haplogrupos das respectivas bacias hidrográficas foi confirmada pelo dendrograma. A grande diferenciação entre *S. maculatus* das bacias do rio Paraná-Paraguai e do rio Tocantins foi evidente e, algumas vezes, maior do que entre espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, presentes no grupo externo.

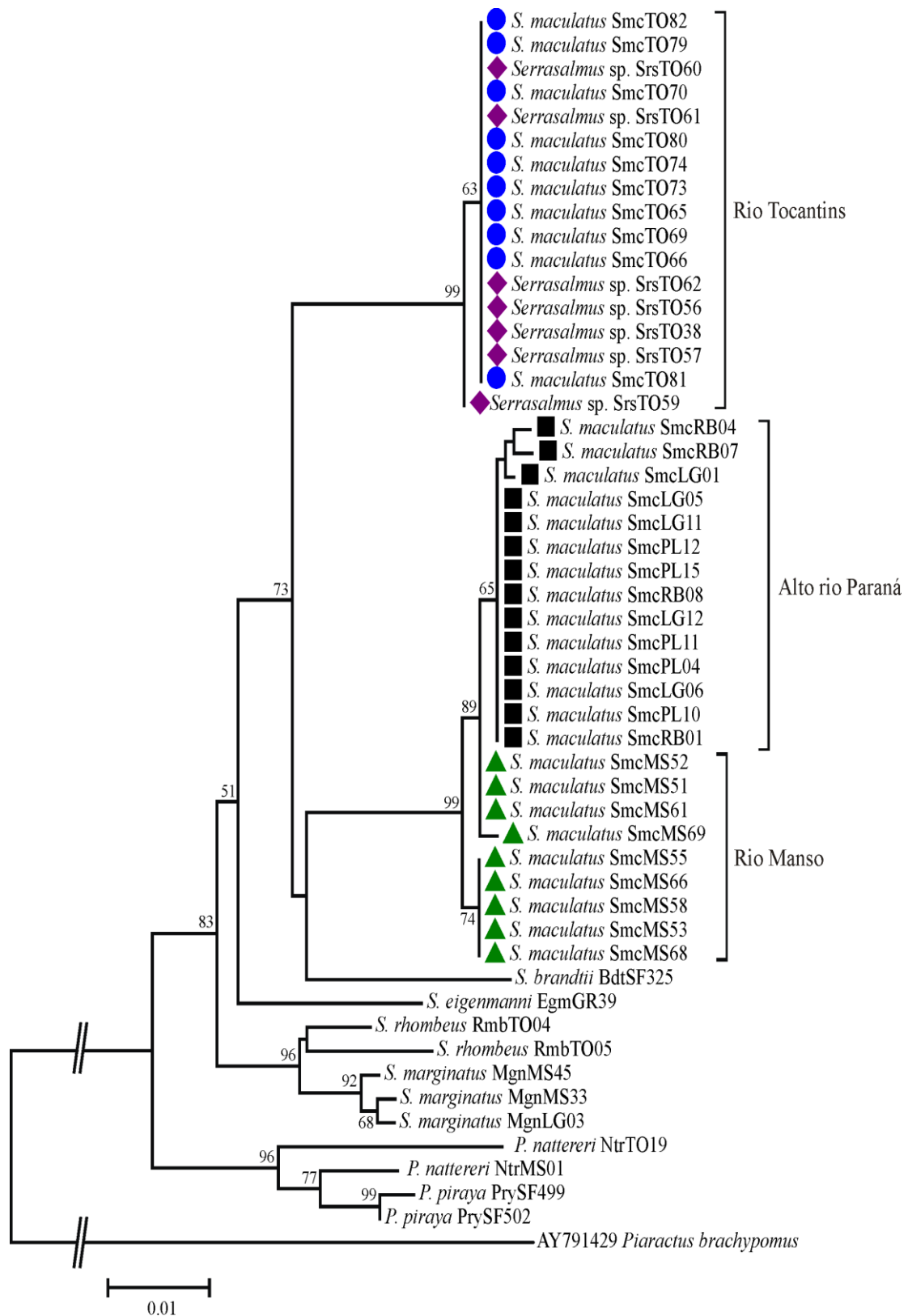


Figura 6 - Dendrograma *neighbor-joining* baseado nas distâncias p do gene mitocondrial citocromo b dos espécimes de *Serrasalmus* sp. e de *S. maculatus* coletados nas bacias do rio Tocantins, alto rio Paraná e rio Manso, além de outras espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Números nas ramificações da árvore representam valores de *bootstrap* baseados em 10.000 reamostragens.

As sequências do gene *cytb* também foram empregadas na análise filogenética *neighbor-joining* baseada no modelo evolutivo HKY + G, selecionado pelo programa *Modeltest* (Figura 7).

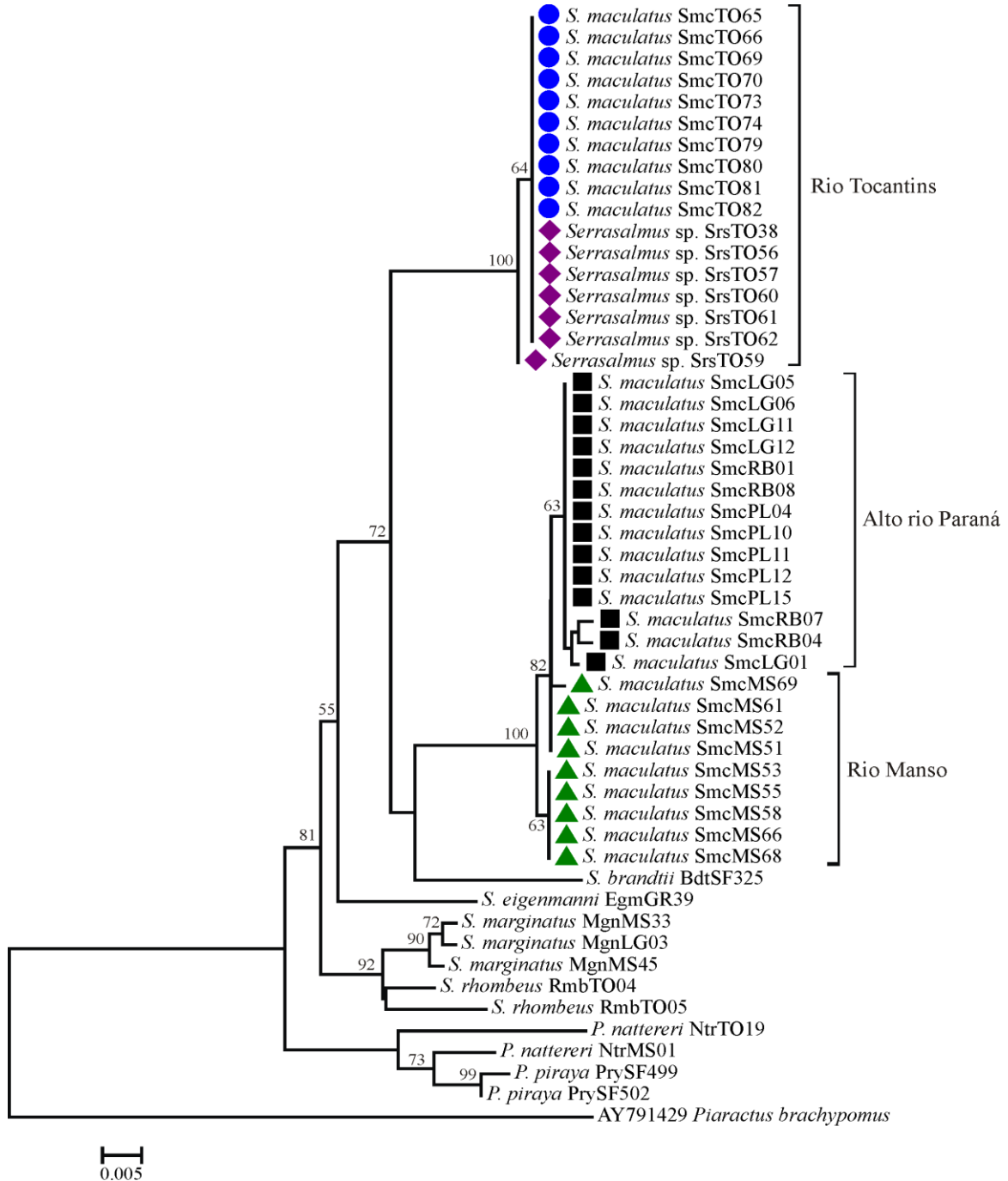


Figura 7 - Dendrograma *neighbor-joining* baseado no modelo evolutivo HKY + G (parâmetros: Nst=2 TRatio=5.4368 Rates=gamma Shape=0.1139) a partir do gene mitocondrial citocromo b de espécimes de *Serrasalmus* sp. e de *S. maculatus* coletados nas bacias do rio Tocantins, alto rio Paraná e rio Manso, além de outras espécies dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Análises de *bootstrap* basearam-se em 10.000 reamostragens.

Os dois gráficos (Figuras 6 e 7) foram congruentes quanto aos resultados, evidenciando a diferenciação, em níveis interespecíficos, entre as populações de *Serrasalmus maculatus*. Essa separação foi apoiada por altos valores de *bootstrap*. Ademais, ambos dendrogramas agruparam *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* do rio Tocantins em um mesmo clado.

O gráfico de dispersão baseado nas distâncias p não corrigidas das sequências do gene *cytb* (Figura 8) corroborou a separação dos haplogrupos de *S. maculatus* das diferentes bacias hidrográficas e a identidade de *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* do rio Tocantins.

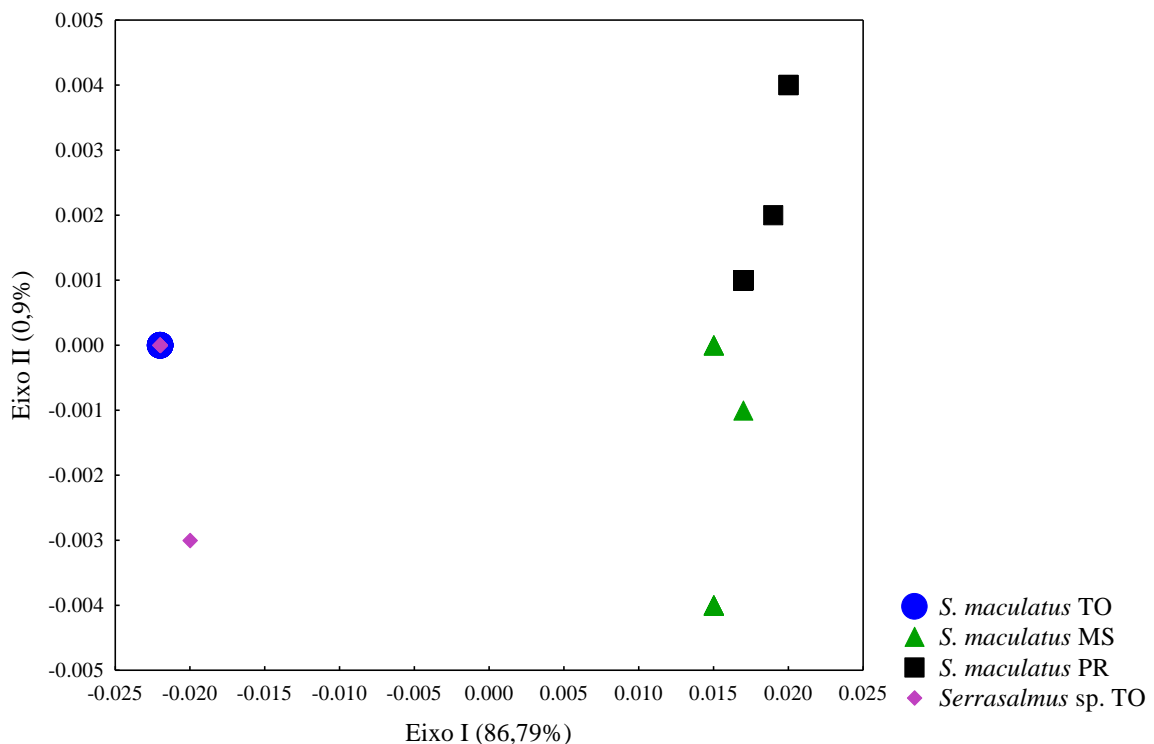


Figura 8 - Gráfico de dispersão 2D da análise de coordenadas principais de populações de *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins (TO), rio Manso (MS) e alto rio Paraná (PR), além de exemplares de *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins, baseado nos autovetores calculados a partir da distância p de sequências do gene mitocondrial citocromo b.

3.3. Gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (*CoxI*)

Foi amplificado e sequenciado um fragmento do genoma mitocondrial de cerca de 700 pb correspondente à parte do gene citocromo c oxidase subunidade I

(*coxI*) de sete exemplares de *S. maculatus* do rio Tocantins, nove do rio Manso, dezesseis do alto rio Paraná e seis espécimes de *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins. Após sequenciamento e edição das sequências, um segmento de boa qualidade com 550 pb foi selecionado para as análises. As regiões sequenciadas foram identificadas com acessos disponibilizados no *GenBank*, por similaridade. A frequência de bases nucleotídicas da região apresentou valores de A = 22,4%, T = 27,9%, C = 31,5% e G = 18,3%. O tipo de substituição mais comum foi transição, com relação $R = si/sv = 18,223$. As taxas da razão transição/transversão foram $k_1 = 56,464$ (purinas) e $k_2 = 21,929$ (pirimidinas). Trinta sítios variáveis e 27 parcimoniosamente informativos ocorreram entre as sequências do gene citocromo c oxidase I.

Análises realizadas pelo programa *DAMBE* identificaram pouca saturação entre as sequências do gene *coxI*. O valor do índice de saturação de substituição observado ($I_{ss} = 0,042$) foi significativamente menor do que o crítico ($I_{ss,c} = 0,7180$ e $0,5048$, para topologias simétricas e assimétricas, respectivamente). A Figura 9 confirmou esses resultados, revelando um padrão de correlação aproximadamente linear.

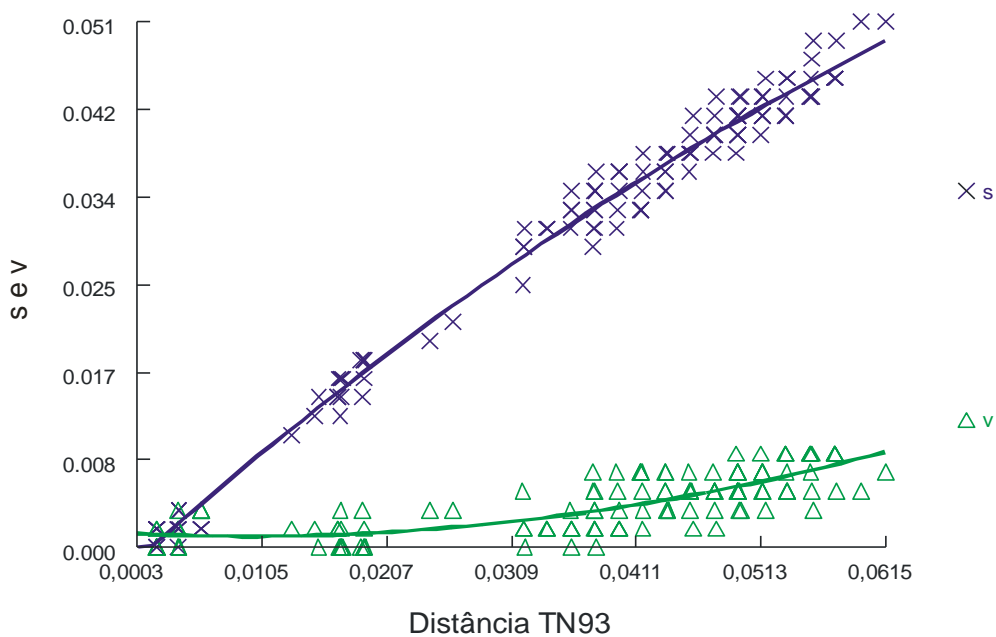


Figura 9 - Gráfico de transição (s) e transversão (v) versus distância de Tamura e Nei (1993) de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase em *Serrasalmus maculatus* e *Serrasalmus* sp., sem o outgroup.

O Quadro 12 mostra o alinhamento das sequências do gene mitocondrial *coxI* realizado por meio do programa *Clustal W*. Foram observados trinta polimorfismos nucleotídicos distribuídos em dez haplótipos, de maneira que o haplótipo Srs-I, detectado em *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins, apresentou mesma sequência nucleotídica do haplótipo Smc-I, encontrado na população de *S. maculatus* também do rio Tocantins. Vários polimorfismos foram exclusivos de determinada população, permitindo, assim, sua caracterização. Dezesete polimorfismos separaram as populações de *S. maculatus* do rio Tocantins e da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai, enquanto seis substituições ocorreram única e exclusivamente em *S. maculatus* do alto rio Paraná e uma em *S. maculatus* do rio Manso. A tradução das sequências parciais do gene *coxI* (550 pb) produziu um total de 182 aminoácidos, sem evidenciar, no entanto, substituição aminoacídica no polipeptídeo.

Quadro 12 - Polimorfismo nucleotídico das sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (*CoxI*; 550b) de populações de *Serrasalmus maculatus* das bacias do alto rio Paraná (SmcPL, SmcLG e SmcRB), rio Manso (SmcMS) e rio Tocantins (SmcTO), além de *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins (SrsTO)

Espécie	Amostras	Haplótipos	11111112222233333444444444555 512233473334502447123444678014 032557633692126171651069430628
<i>S. maculatus</i>	SmcTO65,66,69,70,73,74,80	Smc-I	TGCCTAGTGCGGCAGGTGCAGACGTCTGAC
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO38,56,5759,60,61	Srs-I
<i>S. maculatus</i>	SmcMS51,52,56,57	Smc-II	CA..C..C.TA.TGA.CTT.A.TACTCA..
<i>S. maculatus</i>	SmcMS53	Smc-III	CA..C..C.TA.TGATCAT.A.TACTCA..
<i>S. maculatus</i>	SmcMS55	Smc-IV	CA..CG.C.TA.TGATCAT.A.TACTCA..
<i>S. maculatus</i>	SmcMS58	Smc-V	CA.TC..C.TA.TGATCAT.A.TACTCA..
<i>S. maculatus</i>	SmcMS61	Smc-VI	CA..C..C.TA.TGA.CAT.A.TACTCA..
<i>S. maculatus</i>	SmcMS69	Smc-VII	CATTC..C.TA.TGATCAT.A.TACTCA..
<i>S. maculatus</i>	SmcLG01,06,11, RB01,04,07,PL04	Smc-VIII	C..TC.ACATAATGATC.TGAGTACTCAGT
<i>S. maculatus</i>	SmcRB02,06,08,PL09- 12,14,15	Smc-IX	C..TC.ACATAATGATC.TGAGTACTCAG.

As análises de diversidade haplotípica e nucleotídica baseadas no gene mitocondrial *coxI* (Quadro 13) identificaram a população de *Serrasalmus maculatus* do rio Manso como tendo os maiores valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, de distância p e maior número de haplótipos, seguida pela população da planície de inundação do alto rio Paraná. No entanto, tanto *Serrasalmus maculatus* quanto *Serrasalmus* sp. da bacia do rio Tocantins apresentaram valores nulos para todos esse parâmetros.

Quadro 13 - Diversidades haplotípicas e nucleotídicas obtidas a partir de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (*CoxI*) de populações de *Serrasalmus maculatus* (Smc) e de *Serrasalmus* sp. (Srs) das bacias do rio Tocantins (TO), rio Manso (MS) e alto rio Paraná (PR). n = número de sequências; NH = número de haplótipos; *h* = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, p = distância p

Espécies/ Populações	n	NH	<i>h</i>	π	p
SmcTO	7	1	0,00	0,0000	0,0
SmcMS	9	6	0,83	0,0032	0,3
SmcPR	16	2	0,52	0,0009	0,1
SrsTO	1	1	0,00	0,0000	0,0

Valores médios de distância p encontrados dentro de cada população foram muito reduzidos, evidenciando baixa variabilidade genética com relação a esse gene mitocondrial. No entanto, comparações interpopulacionais revelaram valores de distância p mais elevados, principalmente entre *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins e da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai, com 3,6 e 4,4%, respectivamente (Quadro 14). Esses valores foram semelhantes ou até mesmo maiores do que aqueles encontrados entre outras espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Quadro 14) e também entre espécies de Characiformes (por exemplo, valores de distância p de 1,3%, 1,7% e 3,7% foram identificados entre espécies diferentes dos gêneros de *Bramocharax*, *Mimagoniates* e *Bryconamericus*, respectivamente; Anexo 2; dados não mostrados).

Os dendrogramas baseados nas seqüências do gene mitocondrial *coxI* confirmaram, mais uma vez, os resultados anteriores. A Figura 10 apresenta o dendrograma *neighbor-joining* construído a partir dos valores de distância p. Ficou clara a separação entre as populações de *S. maculatus* das três bacias hidrográficas. No entanto, essa distinção foi mais acentuada entre os espécimes do rio Tocantins e da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai. Por comparações com os indivíduos do grupo externo, pode-se observar que a diferenciação entre as populações do rio Tocantins e da bacia do rio Paraná-Paraguai foi algumas vezes maior do que entre as outras espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Novamente, os espécimes de *Serrasalmus* sp. e de *S. maculatus* do rio Tocantins ficaram agrupados no mesmo clado.

As seqüências *coxI* de piranhas também foram empregadas na análise filogenética *neighbor-joining* baseada no modelo evolutivo selecionado pelo programa *Modeltest* (HKY + G; Figura 11). Os dois dendrogramas (Figuras 10 e 11) foram, no geral, concordantes entre si e apoiaram a separação dos haplogrupos de *Serrasalmus maculatus* por altos valores de *bootstrap*.

Quadro 14 - Valores médios de distância genética entre populações de *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins (SmcTO), rio Manso (SmcMS), alto rio Paraná (SmcPR), e de *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins (SrsTO), além de outras espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, baseados nas distâncias p, obtidos a partir de seqüências do gene citocromo c oxidase subunidade I. Na diagonal, estão representados os valores de distâncias p dentro das populações. Ntr = *P. nattereri*, rio Tocantins e rio Manso; Mgn = *S. marginatus*, bacia Paraná-Paraguai; Rmb = *S. rhombeus*, rio Tocantins; Egm = *S. eigenmanni*, rio Tocantins; Bdt = *S. brandtii*, rio São Francisco

Espécie	Smc TO	Smc MS	Smc PR	Srs TO	Mgn	Rmb	Egm	Bdt	Ntr
SmcTO	0,0								
SmcMS	3,6	0,3							
SmcPR	4,4	1,7	0,1						
SrsTO	0,0	3,6	4,4	0,0					
Mgn	4,8	4,4	4,9	4,8	0,2				
Rmb	4,8	4,3	4,8	4,8	1,6	1,6			
Egm	4,5	4,9	5,4	4,5	2,5	3,4	-		
Bdt	3,6	3,2	3,5	3,6	4,1	3,9	4,2	-	
Ntr	5,7	5,1	5,1	5,7	3,9	4,0	3,9	4,8	1,3

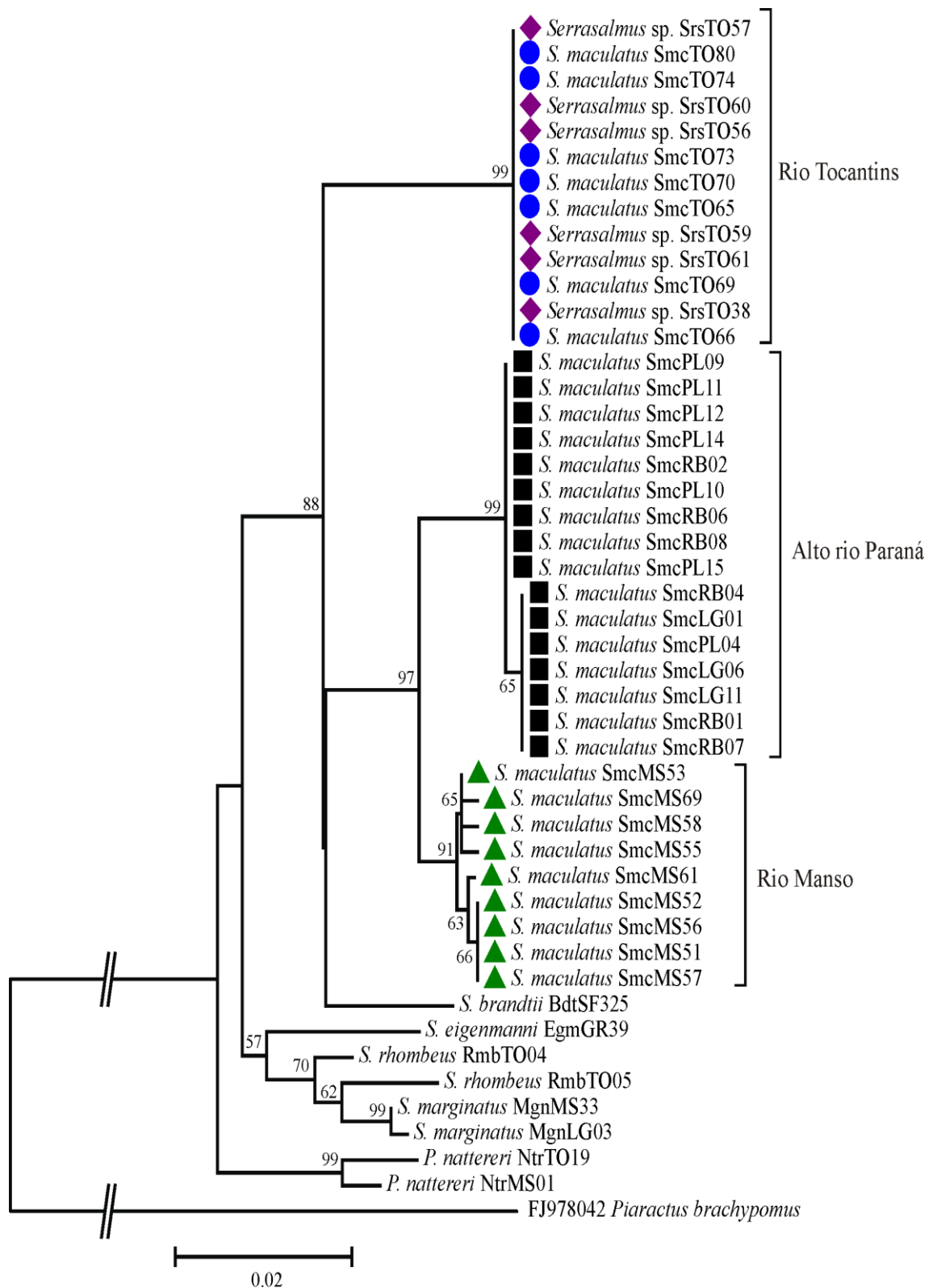
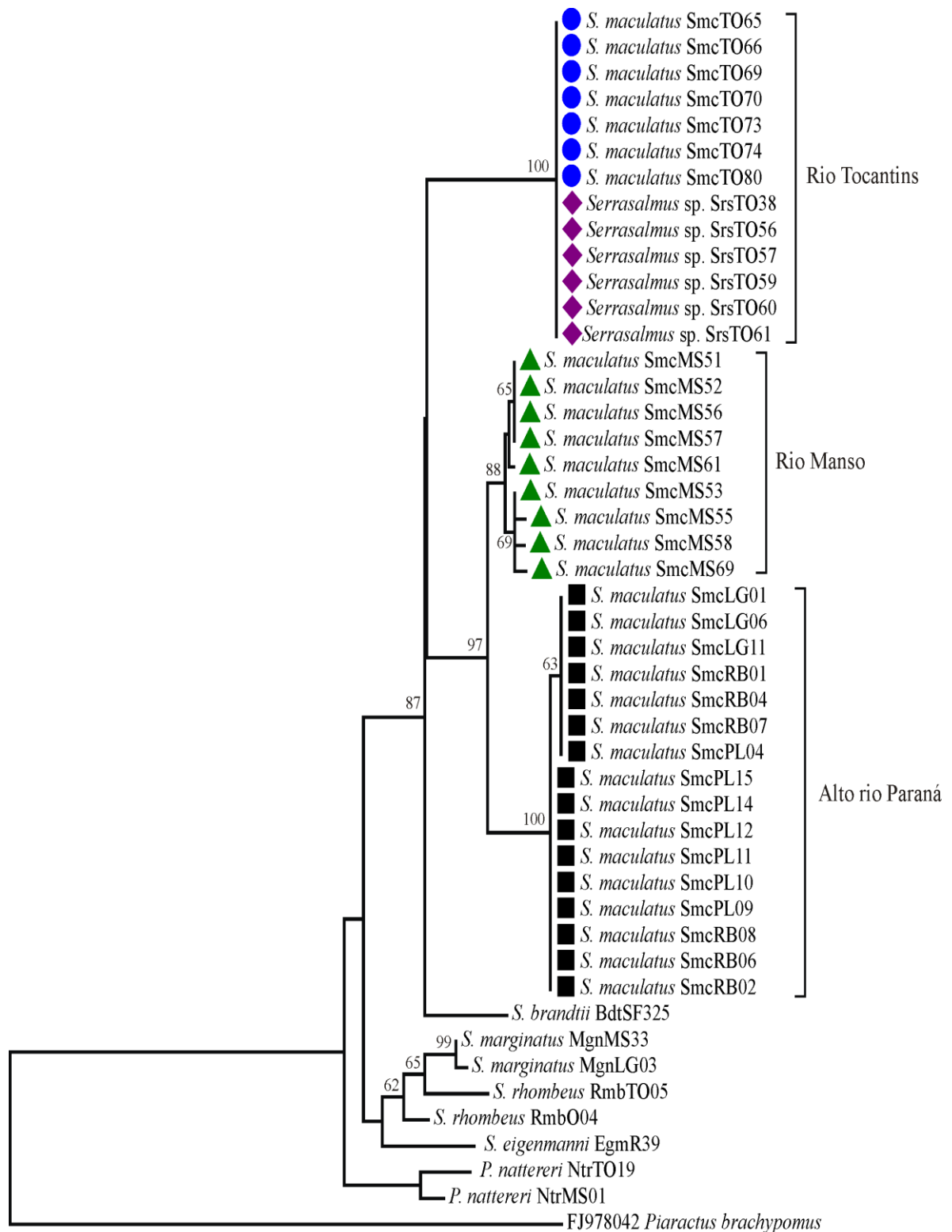


Figura 10 - Dendrograma *neighbor-joining* das distâncias p do gene mitocondrial citocromo c oxidase I dos espécimes de *Serrasalmus* sp. e de *S. maculatus* coletados nas bacias do rio Tocantins, alto rio Paraná e rio Manso, além de outras espécies dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Números nas ramificações da árvore representam valores de *bootstrap* baseados em 10.000 reamostragens.



0.005

Figura 11 - Dendrograma *neighbor-joining* baseado no modelo evolutivo HKY + G (parâmetros: Nst=2 TRatio=7.4461 Rates=gamma Shape=0.2066) a partir de seqüências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I de espécimes de *Serrasalmus* sp. e de *S. maculatus* espécies dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Análises de *bootstrap* basearam-se em 10.000 reamostragens.

Os mesmos agrupamentos identificados nos dendrogramas anteriores foram também detectados no gráfico de dispersão baseado nas distâncias p não corrigidas das sequências do gene *coxI* (Figura 12), confirmando não apenas a separação dos haplogrupos de *S. maculatus*, conforme suas localidades de coleta, como também a identidade entre *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* do rio Tocantins.

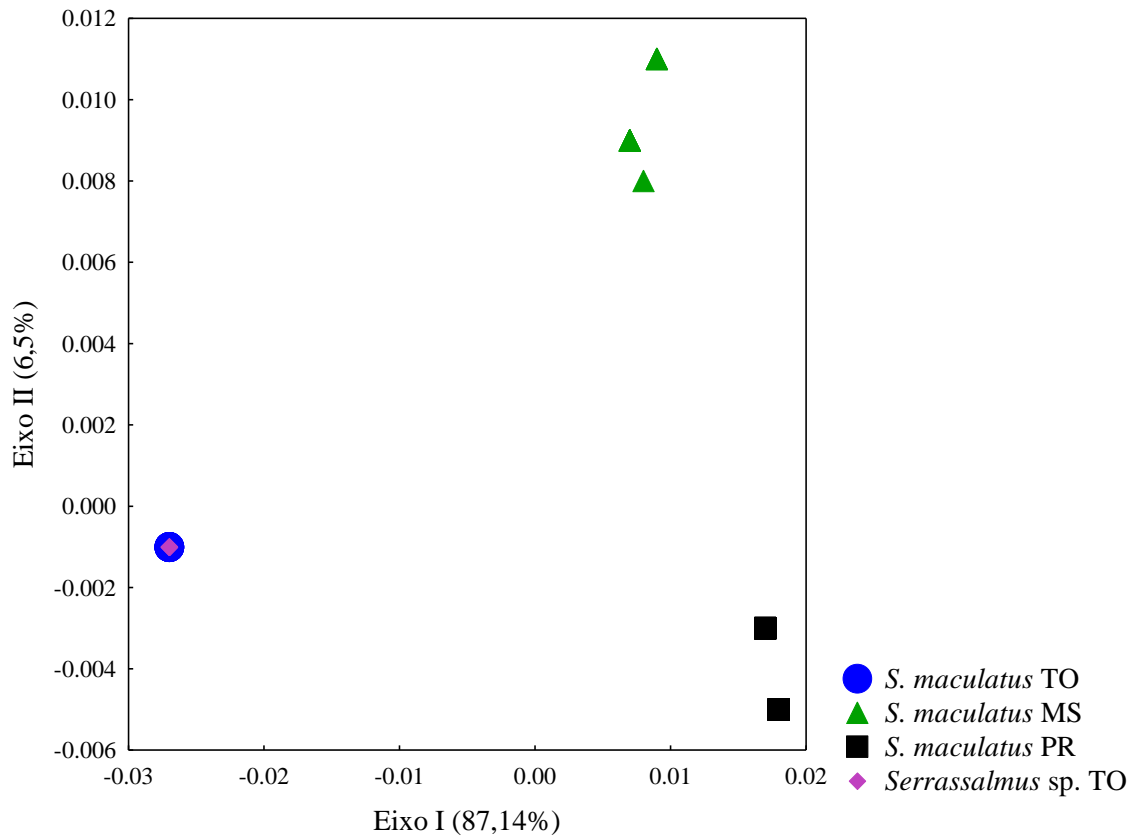


Figura 12 - Gráfico de dispersão em coordenadas principais 2D de populações de *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins (TO), rio Manso (MS) e alto rio Paraná (PR), além de *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins, baseado nos autovetores calculados a partir da distância p de sequências do gene citocromo c oxidase subunidade I.

3.4. Considerações gerais

As espécies *Serrasalmus maculatus* e *Serrasalmus* sp. de ocorrência na bacia do rio Tocantins (Lucinda et al., 2007) não foram diferenciadas com base nas sequências do DNA mitocondrial analisadas no presente estudo. As duas espécies demonstraram ter haplótipos mitocondriais amplamente compartilhados, o que resultou no agrupamento das duas espécies em um único clado em todos os

dendrogramas construídos a partir das sequências do *D-loop* e dos genes *cytb* e *coxI*. O compartilhamento de haplótipos parece indicar que a validade taxonômica dessas espécies deve ser revisada. Uma possibilidade seria que as linhagens não tiveram tempo suficiente para atingir a condição de entidades evolutivamente independentes. Alternativamente, eventos de hibridação, com *S. maculatus* como o parental materno, poderiam estar promovendo a homogeneização genética das duas populações; ou então, a combinação desses fatores.

Sabe-se que, morfologicamente, essas espécies são diferenciadas uma da outra, principalmente com relação ao padrão de coloração (C. S. Agostinho, comunicação pessoal). Assim, marcadores moleculares nucleares devem ser utilizados para esclarecimento dessa questão. Como a molécula do mtDNA é transmitida predominantemente pelo parental materno, o uso de marcadores nucleares indicaria a ocorrência de híbridos interespecíficos na bacia do rio Tocantins. Apesar de não existir, na literatura, relatos da ocorrência de híbridos naturais interespecíficos de piranhas, Cestari e Galletti Jr. (1992b) sugeriram que o citótipo “c”, de ocorrência no baixo rio Paraná, seria resultado de eventos de “hibridação” intraespecífica entre os citótipos “a” e “b” de *Serrasalmus maculatus* do alto e baixo rio Paraná, respectivamente. Hubert et al. (2008) também obtiveram evidências de ter havido, no passado, introgressão seguido de hibridação entre *Serrasalmus* sp. e *S. compressus* e entre *Serrasalmus* sp. e *S. hollandi*, espécies simpátricas do alto rio Madeira. De qualquer maneira, sugere-se que seja feita revisão taxonômica de *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* da bacia do rio Tocantins.

Serrasalmus maculatus está amplamente distribuída pelos rios das bacias Amazônica e Paraná-Paraguai. Além dessa extensa distribuição geográfica, *S. maculatus* apresenta grande variabilidade cariotípica, como descrito anteriormente por Cestari e Galetti Jr. (1992b), Martins-Santos et al. (1994), Nakayama et al. (2000), Centofante et al. (2002) e Nakayama et al. (2002). Os citótipos encontrados na espécie estão associados às bacias hidrográficas, caracterizando diferenças entre as populações. Esses fatores levaram a suposição de que *S. maculatus* possa compreender, na verdade, um complexo de espécies crípticas (Cestari, 1990; Nakayama et al., 2000; Hubert et al., 2006).

A diferenciação entre os espécimes de *Serrasalmus maculatus* do alto rio Paraguai e do alto rio Paraná foi observada não apenas em níveis citogenéticos (Cestari e Galetti Jr., 1992b), mas também moleculares (presente estudo). No entanto, neste estudo, as duas populações apresentaram-se geneticamente diferenciadas entre si por valores relativamente baixos. Além disso, a presença de regiões contendo repetições em tandem, apenas nas sequências do *D-loop* dos espécimes de *S. maculatus* do alto rio Paraná e do rio Manso (bacia do rio Paraguai), sugere que essas populações tiveram uma origem comum. Até algum tempo atrás, antes da construção do reservatório de Itaipu, em 1982, o alto rio Paraná era separado do restante do sistema Paraná-Paraguai pelos saltos de Sete Quedas, uma barreira geográfica natural que impedia a livre dispersão de peixes, principalmente no sentido jusante para montante (Menezes, 1972). Isto é evidenciado pelas diferenças de ictiofauna nas duas regiões. Por exemplo, *S. marginatus* e mais cerca de três dezenas de espécies só atingiram o alto rio Paraná após a submersão de Sete Quedas pelo reservatório de Itaipu (Júlio Jr. et al., 2009). Entretanto, no sentido montante para jusante, talvez a migração de indivíduos ocorresse com certa frequência. Dois eventos poderiam explicar, portanto, os baixos valores de diferenciação genética observados entre as populações de *S. maculatus* do alto rio Paraná e do alto rio Paraguai: eventuais migrações de montante para jusante e a incorporação da subpopulação da região de Itaipu à população do alto rio Paraná.

Diferenças cariotípicas entre as populações de *Serrasalmus maculatus* das bacias hidrográficas Amazônica e do sistema Paraná-Paraguai também foram relatadas anteriormente (Nakayama et al., 2000; Centofante et al., 2002; Nakayama et al., 2002), corroborando nossos resultados. Os marcadores moleculares mitocondriais utilizados nesse trabalho foram eficientes na separação das populações de *S. maculatus* dos rios Tocantins e Paraná-Paraguai. Os valores de distância genética obtidos com *D-loop*, citocromo b e citocromo c oxidase I, baseados tanto na distância p como HKY + G, foram consistentes em indicar diferenciação genética dessas populações. Além disso, a amplitude dessa divergência está de acordo com o encontrado na literatura entre espécies próximas (Perdices et al., 2004; Toffoli et al., 2008; Bignotto et al., 2009).

Valores de distância genética *p* para a região do *D-loop* entre *S. maculatus* do rio Tocantins e *S. maculatus* do rio Manso e do alto rio Paraná foram de 8,8% e 9,5%, respectivamente. Por comparação das distâncias *p* obtidas entre espécies diferentes dos gêneros de Characiformes (*Serrasalmus*, *Pygocentrus*, *Prochilodus*, *Piaractus* e *Mylossoma*), geradas a partir de sequências disponíveis no *GenBank*, verificou-se que os valores encontrados para as duas populações de *S. maculatus* estão em patamares equivalentes às divergências interespecíficas.

O mesmo padrão foi identificado para os genes mitocondriais *cytb* e *coxI*, porém em menor magnitude, uma vez que são regiões mais conservadas que o *D-loop*. Assim, diferenças entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies muito próximas devem ser pouco acentuadas (Avice, 2004). A população de *S. maculatus* do rio Tocantins diferenciou-se daquela encontrada na bacia hidrográfica Paraná-Paraguai por valores de distância *p* que variaram de 3,7% a 3,9%, no caso do gene *cytb*, e de 3,6% a 4,4%, para a região do *coxI*. As distâncias baseadas no modelo evolutivo HKY + G confirmaram que as duas populações divergiram entre si com valores equivalentes a espécies diferentes.

A diferenciação genética entre as populações de *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins e da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai foi detectada não apenas pelos valores de distância genética baseados nas três regiões do genoma mitocondrial, mas também por outras características encontradas especificamente na região controle do *D-loop*. Foi identificado um complexo padrão de variação envolvendo vários *indels* e repetições em tandem na região controle do *D-loop*, próximos a extremidade 5'. A maioria dos *indels* permitiu a caracterização das populações, porém, a diferença mais acentuada foi quando *S. maculatus* do rio Tocantins foi confrontada com a população da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai (Quadro 3). Repetições em tandem também foram identificadas nas sequências do *D-loop*, permitindo, mais uma vez, a diferenciação das populações. Essas regiões estavam presentes exclusivamente em *S. maculatus* da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai, variando no tipo e no número de repetições. Ortí et al. (2008) também detectaram o mesmo tipo de repetição em um espécime de *S. maculatus* do rio Uruguai. Essas repetições em tandem ocorrem tipicamente nas extremidades 5' ou 3' do *D-loop*, onde a replicação do DNA inicia ou

termina, respectivamente (Nesbo et al., 1999), e podem ser relacionadas às variações de tamanho dentro e entre indivíduos ou espécies (Brzuzan, 2000; White e Martin, 2009). Repetições em tandem têm sido documentadas em diversas espécies, inclusive em peixes (Lunt et al., 1998).

Os resultados apresentados indicam, portanto, que existe uma limitada conectividade entre as populações do rio Tocantins e da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai, sugerindo serem linhagens evolutivas independentes. A separação das populações de *S. maculatus* deve ter sido iniciada com a formação das bacias Amazônica e Paraná-Paraguai, há 10 milhões de anos atrás (Ma) (Hubert e Renno, 2006), por vicariância. No entanto, conforme Lundberg et al. (1998), capturas de cabeceiras do sistema Paraná pelo Amazônico continuaram mesmo após o estabelecimento das duas bacias hidrográficas. Os rios Madeira e Guaporé, afluentes do rio Amazonas, encontram as cabeceiras do rio Paraguai. Montoya-Burgos (2003) e Hubert e Renno (2006) identificaram ainda possíveis rotas de dispersão entre as bacias dos rios Madeira e Guaporé e do rio Paraguai. Acredita-se que, mesmo atualmente, ainda haja comunicação entre as bacias em épocas de chuvas, com conseqüente troca de faunas na região. Portanto, tanto eventos de dispersão como de vicariância podem ter influenciado a diferenciação da espécie. De acordo com os valores de divergência genética, é mais plausível que as populações tenham interrompido o fluxo gênico em momento posterior à separação das duas bacias.

Vários trabalhos anteriores confirmam a possibilidade de conexão entre os rios das bacias Amazônica e Paraná-Paraguai. Costa (2003) relatou pela primeira vez uma espécie endêmica da bacia Amazônica (*Moema heterostigma*) na bacia do rio Paraguai. Antunes et al. (2010) obteve evidências de que as relações filogenéticas de peixes do gênero *Brycon* podem estar relacionadas às distribuições geográficas das espécies pelas bacias hidrográficas Amazônica e Paraná-Paraguai. O mesmo foi evidenciado por Aquino e Schaefer (2010) e por Garda e Cannatella (2007) em trabalho com espécies do gênero *Hypoptopoma* e sapos das ordens Anura, Hylidae e Pseudae, respectivamente.

As diferenciações detectadas no presente trabalho indicam que as populações de *S. maculatus* das bacias dos rios Tocantins e Paraná-Paraguai estão isoladas

geograficamente por tempo suficiente para que ocorresse especiação. Apesar de pouco acentuada, a diferenciação poderia estar em patamar igual ao encontrado entre espécies próximas que divergiram em tempo recente. Deste modo, *S. maculatus* constitui um complexo de pelo menos duas espécies morfologicamente semelhantes nas bacias dos rios Tocantins e Paraná-Paraguai.

Valores de diversidade haplotípica e nucleotídica podem indicar os processos pelos quais as populações passaram. Segundo Grant e Bowen (1998), altos valores de h (acima de 0,5) e baixos valores de π (menores que 0,5%), como os observados para *S. maculatus* do alto rio Paraná e, principalmente, do rio Manso, são indicativos de populações que sofreram *bottleneck*, seguido de rápido crescimento populacional e acúmulo de mutações. Assim, os indivíduos que se estabeleceram nas cabeceiras do alto rio Paraguai, provavelmente, por migração da população amazônica, sofreram diminuição de sua população, em um típico efeito *bottleneck*, mas tiveram tempo suficiente para crescer e acumular mutações. Por outro lado, *S. maculatus* do rio Tocantins apresentaram baixos valores de h e de π , indicando que a população passou por um recente *bottleneck* ou efeito fundador de poucas linhagens de DNA mitocondrial.

Portanto, existem fortes evidências de que as populações atualmente identificadas como *Serrasalmus maculatus* das bacias hidrográficas Paraná-Paraguai e do rio Tocantins pertencem a espécies diferentes. Uma vez que a localidade-tipo de *S. maculatus* é a bacia do rio Guaporé (Jégu e Santos, 2001), seria necessária a sua inclusão em trabalhos futuros para determinar se o nome *S. maculatus* deve ser restrito à bacia do rio Tocantins ou ao sistema Paraná-Paraguai.

Deste modo, *S. maculatus* deve ser tratada como um complexo de espécies que está distribuído em várias regiões da América do Sul, ocorrendo também em bacias diferentes daquelas analisadas neste estudo. A ampliação da amostragem de populações de outras bacias poderia revelar outros haplogrupos correspondentes a novas espécies. Deste modo, é provável que as populações identificadas como *S. maculatus* compreenda um complexo de muitas espécies.

4. CONCLUSÕES

a) *Serrasalmus maculatus* e *Serrasalmus* sp. da bacia do rio Tocantins compartilham haplótipos mitocondriais, indicando que ou essas espécies encontram-se erroneamente identificadas, ou estão sofrendo processos de hibridação.

b) *Serrasalmus maculatus* constitui um complexo de pelo menos duas espécies morfológicamente semelhantes nas bacias dos rios Tocantins e Paraná-Paraguai.

c) Marcadores moleculares mitocondriais são eficientes na discriminação de populações da piranha *Serrasalmus maculatus*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, C.S.; HAHN, N.S.; MARQUES, E.E. Patterns of food resource use by two congeneric species of piranhas (*Serrasalmus*) on the upper Paraná River floodplain. **Braz. J. Biol.**, 63:177-182, 2003.
- ANTUNES, R.S.P.; GOMES, V.N.; PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, R.A.; JÚLIO Jr., H.F.; PRIOLI, L.M.; AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, A.J. Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, 9:674-684, 2010.
- AQUINO, A.E.; SCHAEFER, S.A. Systematics of the genus *Hypoptopoma* Günther, 1868 (Siluriformes, Loricariidae). **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.**, 336:1-110, 2010
- ARDURA, A.; LINDE, A.R.; MOREIRA, J.C.; GARCIA-VAZQUEZ, E. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biol. Conserv.**, 143:1438–1443, 2010.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2004. 684p.
- BIGNOTTO, T.S.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; MANIGLIA, T.C.; BONI, T.A.; LUCIO, L.C.; GOMES, V.N.; PRIOLI, R.A.; OLIVEIRA, A.V.; JÚLIO Jr., H.F.; PRIOLI, L.M. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Braz. J. Biol.**, 69: 681-689, 2009. (Supl. 2).
- BRAGA, R.A. **Ecologia e etologia das piranhas do nordeste do Brasil (Pisces, *Serrasalmus Lacépède, 1803*)**. Fortaleza: DNOCS, 1975. 268p.
- BROWN, G.G.; GADALETA, G.; PEPE, G.; SACCONI, C.; SBISA, E. Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. **J. Mol. Biol.**, 192:503-511, 1986.
- BRZUZAN, P. Tandemly repeated sequences in mtDNA control region of whitefish, *Coregonus lavaretus*. **Genome**, 43:584-587, 2000.
- CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 36:135-153, 2005.

CANTATORE, P.; ROBERTI, M.; PESOLE, G.; LUDOVICO, A.; MILELLA, F.; GADALETA, M.N.; SACCONI, C. Evolutionary analysis of cytochrome *b* sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. **J. Mol. Evol.**, 39:589-597, 1994.

CENTOFANTE, L.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Chromosomal polymorphism in *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae, Serrasalminae) from Central Amazon basin. **Caryol.**, 55:37-45, 2002.

CESTARI, M.M. **Diferenciação cromossômica no gênero *Serrasalmus* e evolução do cariótipo em Serrasalminae. Considerações evolutivas e taxonômicas.** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1990. 113p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais).

CESTARI, M.M.; GALETTI Jr., P.M. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguay rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. **Copeia**, 1:108-112, 1992b.

COSTA, W.J.E.M. Moema heterostigma, a new annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the Brazilian Pantanal, Rio Paraguay basin. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, 14:289-294, 2003.

COSTA, A.C.; SALVADOR Jr., L.F.; DOMINGOS, F.F.T.; FONSECA, M.L. Alimentação da pirambeba *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae; Serrasalminae) em um reservatório do Sudeste Brasileiro. **Acta Sci. Biol. Sci.**, 27:365-369, 2005.

DREW, J.A.; ALLEN, G.R.; ERDMANN, M.V. Congruence between mitochondrial genes and color morphs in a coral reef fish: population variability in the Indo-Pacific damselfish *Chrysiptera rex* (Snyder, 1909). **Coral Reefs**, 29:439-444, 2010.

FREEMAN, B.; NICO, L.G.; OSENTOSKI, M.; JELKS, H.L.; COLLINS, T.M. Molecular systematic of Serrasalminidae: Deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. **Zootaxa**, 1484:1-38, 2007.

GARDA, A.A.; CANNATELLA, D.C. Phylogeny and biogeography of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudae) inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA. **Mol. Phyl. Evol.**, 44:104-114, 2007.

GOULDING, M. **The fishes and the forest: exploration in Amazonian natural history**. Berkeley: University of California, 1980. 280p.

GRANT, W.S.; BOWEN, B.W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **J. Hered.**, 89:415–426, 1998.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, 41:95-98, 1999.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM S.; WAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, 270:596–599, 2003.

HUBERT, N.; TORRICO, J.P.; BONHOMME, F.; RENNO, J-F. Species polyphyly and mtDNA introgression among three *Serrasalmus* sister-species. **Mol. Phyl. Evol.**, 46:375-381, 2008a.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; RIVEIRA, R.; RENNO, J-F. Evidence of reproductive isolation among closely related sympatric species of *Serrasalmus* (Ostariophysii, Characidae) from the Upper Madeira River, Amazon, Bolivia. **J. Fish Biol.**, 69:31-51, 2006. (Supl. A).

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

IVANOVA, N.V.; ZEMLAK, T.S.; HANNER, R.H.; HEBERT, R.H. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Mol. Ecol. Notes**, 1-5, 2007.

JÉGU, G.M. Subfamily Serrasalminae (Pacus and piranhas). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr., C.J. (eds.). **Check-List of freshwater fishes from South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.182-196.

JÉGU, M.; SANTOS, G.M. Mise au point à propos de *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 et réhabilitation de *S. maculatus* Kner, 1858 (Characidae: Serrasalminae). **Cybium**, 25:119-143, 2001.

JÚLIO Jr, H.F.; TÓS, C.D.; AGOSTINHO, A.A.; PAVANELLI, C.S. A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. **Neotrop. Ichthyol.**, 7:709-718, 2009.

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

KNER, R. Zyr Familie der Characinen. II. Folge. **Sitzungsber. Akad. Wiss.**, 32:163-168, 1858.

KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proc Natl Acad Sci USA**, 86:6196-6200, 1989.

KUMAR, S.; GADAGKAR, S.R. Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. **J. Mol. Evol.**, 51:544-553, 2000.

LEGENDRE, P.; ANDERSON, M.J. 1998. **Program DistPCoA**. Montréal: Université de Montréal, 1998.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25:1451-1452, 2009.

LIMA, D.; FREITAS, J.E.P.; ARAUJO, M.E.; SOLÉ-CAVA, A.M. Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius saporator*. **J. Exp. Marine Biol. Ecol.**, 320:211– 223, 2005.

LOWE, T.M.; EDDY, S.R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. **Nucleic Acids Res.**, 25:955-964, 1997.

LUCINDA, P.H.F.; FREITAS, I.S.; SOARES, A.B.; MARQUES, E.E.; AGOSTINHO, C.S.; OLIVEIRA, R.J. Fish, Lajeado Reservoir, rio Tocantins drainage, State of Tocantins, Brazil. **Check List**, 3:70-83, 2007.

LUNDBERG, J.G.; MARSHALL, L.G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M.C.S.L.; WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American Rivers. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 13-48.

LUNT, D.H.; WHIPPLE, L.E.; HYMAN, B.C. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. **Mol. Ecol.**, 7:1441-1455, 1998.

MACHADO-ALLISON, A.; GARCIA, C. Food habits and morphological changes during ontogeny in three Serrasalmin fish specie of the Venezuelan flood-plains. **Copeia**, 1:193-195, 1986.

MARTINS-SANTOS, I.C.; JULIO Jr., H.F.; SANTOS, S.J. Chromosome study of two species of the genus *Serrasalmus* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná River. **Cytologia**, 59:175-181, 1994.

MENEZES, N.A. Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das grandes bacias fluviais do Brasil. In: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí. **Poluição e piscicultura: notas sobre poluição, ictiologia e piscicultura**. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública: Secretaria da Agricultura. Instituto de Pesca da C.P.R.N., 1972. p. 73-78.

MEYER, A.; KOCHER, T.D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A.C. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**, 347:550-553, 1990.

MONESI, N.; JACOBS-LORENA, M.; PAÇO-LARSON, M.L. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, 107:559-569, 1998.

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

NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. A comparative cytogenetic study of five piranha species (*Serrasalmus*, Serrasalminae) from the Amazon basin. **Genetica**, 114:231-236, 2002.

NAKAYAMA, C.M.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Ocorrência de dois citótipos em *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characiformes, Serrasalmidae) da região de confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas, Brasil. **Acta Amaz.**, 30:149-154, 2000.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford University Press Inc., 2000. 333p.

NESBO, C.L.; FOSSHEIM, T.; VOLLESTAD, L.A.; JAKOBSEN, K.S. Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. **Mol. Ecol.**, 8:1387-1404, 1999.

OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; BIGNOTTO, T.S.; JÚLIO Jr., H.F.; CARRER, H.; AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, L.M. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. **J. Fish Biol.**, 69:260–277, 2006.

ORTÍ, G.; SIVASUNDAR, A.; DIETZ, K.; JÉGU, M. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genet. Mol. Biol.**, 31:343-351, 2008. (Supl. 1).

PAIVA, M.P. **Grandes represas do Brasil**. São Paulo: Editerra Editorial, 1982. 292p.

PERDICES, A.; CUNHA, C.; COELHO, M.M. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences. **Mol. Phyl. Evol.**, 31:192-203, 2004.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, 14:817-818, 1998.

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO Jr., H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Gen. Mol. Biol.**, 25:421-430, 2002.

ROSENTHAL, A.; O. COUTELLE; M. CRAXTON. Large-scale of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. **Nucl. Acids Res.**, 21:173-174, 1993.

SAZIMA, I.; MACHADO, F.A. Underwater observations of piranhas in western Brazil. **Environm. Biol. Fishes**, 28:17-31, 1990.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Mol Ecol.**, 10:407-417, 2001.

STATSOFT INC. **Statistica 6: data analysis software system**. Tulsa, 2001. WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>. Acesso em: 15, junho, 2010.

SWOFFORD, D.L. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other Methods Version 4**. Sunderland, Ma: Sinauer Associates, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, 24:1596-1599, 2007.

TAMURA K, NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. **Mol. Biol. Evol.**, 10:512–526, 1993.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids Res.**, 22:4673-4680, 1994.

TOFFOLI, D.; HRBEK, T.; DE ARAÚJO, M.L.G.; DE ALMEIDA, M.P.; CHARVET-ALMEIDA, P.; FARIAS, I.P. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). **Genet. Mol. Biol.**, 31:324-336, 2008. (Supl. 1).

WARD, R.D.; ZEMLAK, S.Z.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. **Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.**, 360:1847-1857, 2005.

WHITE, M.M.; MARTIN, H.R. Structure and conservation of tandem repeats in the mitochondrial DNA control region of the least brook lamprey (*Lampetra aepyptera*). **J. Mol. Evol.**, 68:715–723, 2009.

XIA, X.H.; XIE, Z.H. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **J. Heredity**, 92:371-373, 2001.

XIA, X.H.; XIE, Z.H.; SALEMI, M.; CHEN, L.; WANG., Y. An index of substitution saturation and its application. **Mol. Phyl. Evol.**, 26:1-7, 2003.

CAPÍTULO II

Relações genéticas e filogenéticas de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Characiformes, Serrasalminidae) baseadas em marcadores moleculares mitocondriais

RESUMO

As relações genéticas e filogenéticas de diferentes espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* foram examinadas por meio do sequenciamento parcial de dois genes mitocondriais (citocromo b e citocromo c oxidase I). Apesar de diversos estudos anteriores terem abordado a filogenia do grupo, muitas relações internas entre os táxons ainda não estão bem estabelecidas. Foram realizadas análises filogenéticas *neighbor-joining*, máxima verossimilhança e de inferência bayesiana. Em geral, os resultados indicaram maior proximidade genética entre as duas espécies de *Pygocentrus* (*P. nattereri* e *P. piraya*), entre *Serrasalmus rhombeus* e *S. marginatus* e entre *S. maculatus* e *S. brandtii*. O posicionamento de *S. eigenmanni* nos dendrogramas, no entanto, foi controverso. Dependendo do gene analisado e das metodologias empregadas, a espécie foi alocada como irmã do clado formado por *S. rhombeus* e *S. marginatus*, ou como mais próxima do grupo constituído por *S. maculatus* e *S. brandtii*. *Serrasalmus rhombeus* e *Pygocentrus nattereri* apresentaram elevada variabilidade genética. Foram obtidas evidências de que essas espécies têm, cada uma, pelo menos duas linhagens mitocondriais divergentes que, atualmente, ocorrem em simpatria (*S. rhombeus*) ou em alopatria (*P. nattereri*). Os valores de distância genética entre os dois grupos de *S. rhombeus* foram equivalentes ao registrado entre essa espécie e *S. marginatus*. Assim, é possível que *S. rhombeus* compreenda um complexo de espécies. Outro complexo de espécies crípticas dentro das piranhas foi detectado em *S. maculatus*. Foi confirmada grande proximidade genética entre *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. A condição monofilética de *Pygocentrus* foi identificada, porém para *Serrasalmus*, o monofiletismo não foi corroborado em todas as análises.

Genetic and phylogenetic relationships of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus* (Characiformes, Serrasalminidae) based on mitochondrial molecular markers

ABSTRACT

Genetic and phylogenetic relationships among different piranha species of *Serrasalmus* and *Pygocentrus* genera were evaluated by partial sequencing of two mitochondrial genes (cytochrome b and cytochrome c oxidase I). Previous studies have addressed the phylogeny of the group, but many internal relationships among taxa are not yet well established. Phylogenetic analysis of neighbor-joining, maximum-likelihood and Bayesian approach were performed. Results indicated, in general, greater genetic similarity between the two species of *Pygocentrus* (*P. nattereri* and *P. piraya*), between *Serrasalmus rhombeus* and *S. marginatus* and between *S. maculatus* and *S. brandtii*. Nevertheless, the placement of *S. eigenmanni* in dendograms was controversial. This species was placed or as the sister clade of *S. rhombeus* and *S. marginatus*, or close to *S. maculatus* and *S. brandtii* clade, depending on the gene analyzed and methodology utilized. *Serrasalmus rhombeus* and *Pygocentrus nattereri* showed high genetic variability. These species have each one, at least two different mitochondrial lineages that, currently, occur in sympatry (*S. rhombeus*) or in allopatry (*P. nattereri*). Genetic distance values detected between the two groups of *S. rhombeus* were equivalent to those found between *S. rhombeus* and *S. marginatus*. Hence, it is possible that *S. rhombeus* consist of a species complex. Another cryptic species complex within piranha was detected in *S. maculatus*. Moreover, the great genetic similarity between *Serrasalmus* and *Pygocentrus* was accomplished. The monophyletic condition of *Pygocentrus* genera was identified, however the same was not observed for *Serrasalmus*.

1. INTRODUÇÃO

A ordem Characiformes compreende 18 famílias amplamente distribuídas pela África, América Central e do Sul e sul da América do Norte e inclui os peixes de água doce mais diversificados (Nelson, 2006). Uma dessas famílias é Serrasalminidae, com peixes comumente conhecidos como piranhas, pacus e tambaquis. As piranhas constituem o grupo mais especioso, com espécies incluídas em quatro gêneros: *Serrasalmus* (28 espécies), *Pygocentrus* (três ou quatro), *Pristobrycon* (cinco) e *Pygopristis* (uma) (Jégu, 2003; Freeman et al., 2007).

A maioria das espécies de piranhas ocupa ambientes lênticos (Goulding, 1980; Sazima e Machado, 1990; Agostinho e Júlio Jr., 2002), com exceção de algumas espécies de grande porte, como *S. rhombeus*, que vivem em habitats de rios (Goulding, 1980). São também comuns em diversos reservatórios e regiões alagadas (Villares Jr. et al., 2008). Encontram-se amplamente distribuídas por toda a América do Sul, incluindo rios das bacias Amazônica, do rio Orinoco, Guianas, do Araguaia-Tocantins, do Paraná-Paraguai e do rio São Francisco (Jégu, 2003). Segundo Braga (1975), são peixes gregários, estacionários e não propriamente migradores, apresentando deslocamentos reduzidos.

Morfologicamente, as piranhas são caracterizadas pelo corpo comprimido lateralmente, nadadeira dorsal longa com mais de 16 raios e presença de escamas abdominais modificadas em forma de serras afiadas. Além disso, todas as espécies exibem apenas uma fileira de dentes nas duas maxilas. Os dentes são tipicamente triangulares, pontudos e em formato de lâmina, sendo utilizados para perfurar e rasgar. A maioria das espécies possui dentes com três cúspides, mas *Pygopristis* apresenta dentes pentacúspides (Machado-Allison, 1985; Freeman et al., 2007).

Durante muito tempo, as piranhas foram incluídas dentro da subfamília Serrasalminae, pertencente à família Characidae. Porém, recentes estudos filogenéticos sugerem fortemente que a família Characidae seja não-monofilética e que as piranhas, juntamente com pacus e tambaquis, devam ser incluídos em uma família separada, família Serrasalminidae (Calcagnotto et al., 2005; Mirande, 2009).

A sistemática e a taxonomia de piranhas são relativamente complicadas e muito ainda permanece sem esclarecimento. Freeman et al. (2007) citam várias razões que justificam a dificuldade em delimitar corretamente as espécies de piranhas. Uma vez que diversas espécies permanecem sem correta identificação, a sistemática do grupo é complexa e pouco compreendida. Para exemplificar, o gênero *Serrasalmus*, que compreende 28 das 38 espécies de piranhas, provavelmente abrange várias linhagens (Ortí et al., 1996).

Estudos morfológicos e moleculares concordam com a hipótese de que os gêneros de piranhas *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus*, juntamente com *Catoprion*, constituem uma unidade monofilética da família Serrasalmidae. Entretanto, as relações internas do grupo ainda não estão bem estabelecidas, sugerindo-se que pelo menos dois gêneros, *Serrasalmus* e *Pristobrycon*, não sejam monofiléticos (Ortí et al., 1996, 2008; Freeman et al., 2007).

A caracterização genética desse grupo de peixes é, portanto, fundamental para auxiliar no esclarecimento das relações filogenéticas entre espécies de piranhas e confirmar a identidade das mesmas. Marcadores moleculares mitocondriais representam importante ferramenta para estudos de diversidade genética e evolução de peixes, sendo comumente usados também em estudos de filogeografia e filogenia (Ortí et al., 2008; Javonillo et al., 2010; Thomé et al., 2010). Como a molécula do DNA mitocondrial é de fácil isolamento, apresenta pouca recombinação e possui regiões com alta taxa de substituição (Avice et al., 1987), vários segmentos são utilizados em estudos genéticos. O citocromo b (*cytb*) é considerado um dos genes mais úteis para estudos filogenéticos, além de ser relativamente bem conhecido com relação à estrutura e função de seu produto protéico (Esposti et al., 1993). O gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (*coxI*) tem sido bastante empregado recentemente na taxonomia molecular para caracterização e identificação de espécies (Hebert et al., 2003).

O objetivo desse trabalho foi utilizar sequências parciais de genes do DNA mitocondrial (*cytb* e *coxI*) para elucidar as relações genéticas e filogenéticas de piranhas. Foram analisadas espécies dos gêneros *Serrasalmus* (*S. maculatus*, *S. marginatus*, *S. eigenmanni*, *S. rhombeus*, *S. brandtii* e *Serrasalmus* sp.) e *Pygocentrus*

(*P. nattereri* e *P. piraya*) presentes nas bacias do alto rio Paraná, alto rio Paraguai, rio São Francisco e rio Tocantins. Um objetivo adicional foi investigar a condição monofilética do gênero *Serrasalmus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Foram coletados e analisados, no total, cem espécimes de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Quadro 1; Anexo 3). As coletas dos exemplares foram realizadas nas bacias do alto rio Paraná, alto rio Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco (Figura 1). Uma amostra de tecido muscular dos indivíduos foi fixada em álcool etílico comercial em frascos individuais, imediatamente após as coletas, identificados conforme espécie e local de coleta e, posteriormente, mantidos em freezer a -20°C para preservação das amostras até o momento de extração do DNA.

Quadro 1 - Lista das espécies de piranhas dos gêneros *Pygocentrus* e *Serrasalmus* analisadas no presente estudo (Código: abreviação das espécies; N: número de indivíduos analisados; Testemunho: NUP – número de catálogo na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura - Nupélia; UNT – Laboratório de Ictiologia e Sistemática da Universidade Federal do Tocantins)

Espécie	Código	Local de coleta	N	Testemunho
<i>P. nattereri</i>	NtrTO	Rio Tocantins	8	UNT 8148
<i>P. nattereri</i>	NtrMS	Rio Manso (Alto rio Paraguai)	7	NUP 886
<i>P. piraya</i>	PrySF	Rio São Francisco	5	
<i>S. marginatus</i>	MgnMS	Rio Manso (Alto rio Paraguai)	5	NUP 885
<i>S. marginatus</i>	MgnLG	Lagoa das Garças (Alto rio Paraná)	2	NUP 6374
<i>S. marginatus</i>	MgnRB	Rio Baía (Alto rio Paraná)	2	NUP 6374
<i>S. marginatus</i>	MgnPL	Planície de Inundação do alto rio Paraná	7	NUP 6374
<i>S. rhombeus</i>	RmbTO	Rio Tocantins	8	
<i>S. eigenmanni</i>	EgmGR	Rio Tocantins	6	
<i>S. brandtii</i>	BdtSF	Rio São Francisco	4	
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO	Rio Tocantins	7	UNT 8021
<i>S. maculatus</i>	SmcTO	Rio Tocantins	10	UNT 8175
<i>S. maculatus</i>	SmcMS	Rio Manso (Alto rio Paraguai)	11	NUP 884
<i>S. maculatus</i>	SmcLG	Lagoa das Garças (Alto rio Paraná)	5	NUP 4208
<i>S. maculatus</i>	SmcRB	Rio Baía (Alto rio Paraná)	6	NUP 4208
<i>S. maculatus</i>	SmcPL	Planície de Inundação do alto rio Paraná	7	NUP 4208

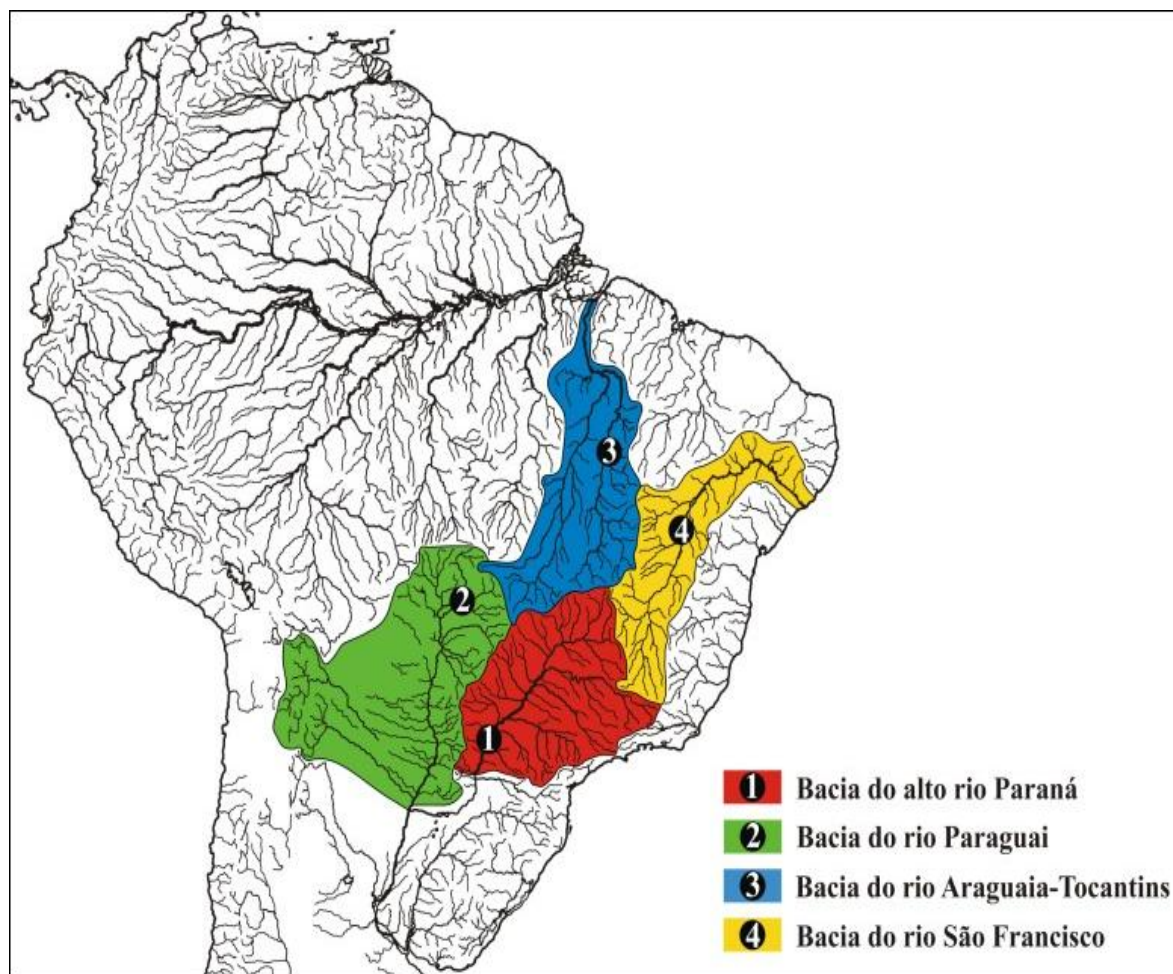


Figura 1 - Áreas de coleta de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Os números correspondem aos pontos de coleta das respectivas bacias: (1) planície de inundação do alto rio Paraná, (2) rio Manso, (3) rio Tocantins, (4) rio São Francisco.

2.2. Áreas de estudo

2.2.1. Planície de inundação do alto rio Paraná

O Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá possui uma base avançada no município de Porto Rico, PR. Esta área localiza-se imediatamente à jusante da barragem de Porto Primavera, cerca de 200 km à montante do remanso do reservatório de Itaipu, e pertence ao terço inferior do alto rio Paraná. Este se constitui no único trecho do rio com leito ainda não represado. Do lado do Estado do Mato Grosso do Sul, encontra-se a planície de inundação do alto rio Paraná, constituída por intensa rede de canais secundários, o rio Baía e os cursos inferiores de rios marginais e várzeas. Antes da formação do reservatório de Porto Primavera, a área era freqüentemente alagada na

época chuvosa do ano. Atualmente, as inundações estão dependentes da abertura de comportas de usinas situadas à montante da planície.

As coletas de *Serrasalmus maculatus* e de *S. marginatus* foram realizadas no rio Baía e na Lagoa das Garças, nos pontos de coordenadas geográficas 22°43'S; 53°17'W e 22°43'S; 53°13'W, respectivamente, além de outros locais ao longo do alto rio Paraná.

2.2.2. Rio Manso

Este rio está localizado na bacia do alto rio Paraguai. É afluente do rio Cuiabá, um dos formadores do rio Paraguai. Está na área de influência da APM Manso de Furnas Centrais Elétricas S/A, no rio Manso, localizando-se a cerca de 35 km à jusante da barragem do reservatório. Foram coletados exemplares de *Serrasalmus maculatus*, *S. marginatus* e *Pygocentrus nattereri* no ponto de coordenadas geográficas 14°48'S; 50°06'W.

2.2.3. Bacia do rio Tocantins

O rio Tocantins possui uma extensão total de aproximadamente 2.500 km e forma-se a partir dos rios das Almas e Maranhão. Esses rios apresentam suas cabeceiras localizadas no Planalto de Goiás, a mais de 1.000 m de altitude, na região mais central do Brasil. O rio Tocantins é o afluente da margem direita do rio Amazonas mais próximo de sua foz, no oceano Atlântico. A área de drenagem total da bacia do Tocantins é de 767.000 km² e tem como principal afluente o rio Araguaia. As coletas foram realizadas em diversos pontos do rio Tocantins, bem como no rio das Almas e no córrego Traçadal (afluente da margem direito do rio Tocantins). Espécimes de *Serrasalmus maculatus*, *Serrasalmus* sp., *S. eigenmanni*, *S. rhombeus* e *Pygocentrus nattereri* foram coletados nessa bacia hidrográfica.

2.2.4. Bacia do rio São Francisco

A bacia do rio São Francisco é a terceira maior do Brasil, drenando uma área de 631.133 km², o que corresponde a 7,4% do território nacional (Sato e Godinho,

2004) e abrange as regiões do Norte, Nordeste e Centro-Oeste (Paiva, 1982). É a única bacia exclusivamente brasileira. Seu curso principal tem uma extensão de 2.700 km entre as cabeceiras, na Serra da Canastra, em terras do município de São Roque de Minas (MG), e a foz, no Oceano Atlântico, entre os estados de Sergipe e Alagoas. No rio São Francisco, foram coletadas duas espécies de piranhas: *Serrasalmus brandtii* e *Pygocentrus piraya*.

2.3. Extração de DNA genômico

Para extração do DNA total, foi utilizada metodologia baseada em fenol/clorofórmio (Monesi et al., 1998), com algumas modificações. Amostras de tecido muscular retiradas de cada peixe foram maceradas e homogeneizadas em 500 µL de tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%), 500 µL tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Espermidina 0,15 mM) e 5 µL proteinase K (20 µg/µL), por duas horas em banho-maria e com agitação a 50°C. Posteriormente, o DNA foi purificado com fenol/clorofórmio (1:1, v:v) e clorofórmio, respectivamente, sendo centrifugado a 12.000 rpm durante 12 minutos.

A precipitação do DNA extraído foi realizada com adição de solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado, seguido de incubação a -20°C por 12-24 horas. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* obtido foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 30 µL de tampão TE (Tris-HCl 1 mM pH 8 e EDTA 0,1 mM) com RNase (20 µg/mL). O DNA foi armazenado em temperatura de -20°C

As amostras foram quantificadas por comparação com concentrações conhecidas de DNA do fago λ, em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (20 µg/100 mL) e fotografado pelo sistema EDAS 290 (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

2.4. DNA mitocondrial e amplificação via PCR

Os fragmentos do genoma mitocondrial citocromo b (*cytb*) e citocromo c oxidase subunidade I (*coxI*) foram usados para avaliação das relações filogenéticas de

piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. As condições de amplificação via PCR foram baseadas em Prioli et al. (2002). Para cada região, foi empregado um par de primers específico (Quadro 2). Os primers H16498 e L14841 foram utilizados para amplificação do gene *cytb*. Esse par de primers amplifica um segmento de quase 1.700 pares de base (pb) que compreende parte do gene *cytb*, parte da região controle do *D-loop* e as seqüências completas dos genes tRNA^{Thr} e tRNA^{Pro}, que codificam os tRNAs dos aminoácidos treonina e prolina, respectivamente. O segundo fragmento, com cerca de 700 pb, foi amplificado com os primers H7152 e L6448-F1 e corresponde a uma seqüência parcial do gene *coxI*.

Quadro 2 - Primers utilizados na amplificação dos segmentos *cytb* e *coxI* do DNA mitocondrial e suas respectivas seqüências nucleotídicas

Primer	Gene	Seqüência nucleotídica	Referência
H16498	<i>Cytb</i>	5' -CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3'	Meyer et al., 1990
L14841	<i>Cytb</i>	5' -CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	Kocher et al., 1989
H7152	<i>CoxI</i>	5' -CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA-3'	Ivanova et al., 2007
L6448-F1	<i>CoxI</i>	5' -TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	Ward et al., 2005

Os fragmentos foram amplificados em duas reações independentes de PCR para depois serem seqüenciados e analisados. O volume final da reação foi de 25 µL, constituído de Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µM de cada primer, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, 15 ng de DNA e água deionizada e filtrada em equipamento Milli-Q para completar o volume para 25 µL. As amplificações dos fragmentos foram executadas em termociclador programado para diferentes perfis de temperatura, dependendo do primer utilizado. O seguinte perfil térmico foi usado para amplificação da região *cytb*: um ciclo inicial de 4 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 59-61°C e 2 minutos a 72°C, e um último ciclo de 10 minutos a 72°C. Para a região *coxI*, foram utilizados um ciclo inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 52-55°C e 1 minuto a 72°C, além de uma etapa final de 10 minutos a 72°C.

A eficiência da amplificação foi confirmada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL) e os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados ao padrão de tamanho molecular *Ladder* 100 pb (Invitrogen). Posteriormente, as amostras foram purificadas com polietilenoglicol para eliminação do excesso de primers e resíduos de nucleotídeos, segundo protocolo de Rosenthal et al. (1993).

2.5. Sequenciamento

Após as quantificações, os fragmentos obtidos foram novamente amplificados unidirecionalmente com os primers L14841, para a região do *cytb*, e L6448-F1, para a região do *coxI*. Cerca de 50 ng de DNA do produto final de cada reação de PCR foram usados diretamente como molde para seqüenciamento com *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* em plataforma *MegaBace* (Amersham), de acordo com instruções do fabricante.

2.6. Verificação de saturação

Sequências de DNA podem apresentar-se saturadas devido a múltiplas substituições em um mesmo sítio nucleotídico, levando à subestimação do número de substituições e, portanto, afetando a reconstrução filogenética. Sabe-se que genes mitocondriais evoluem rapidamente, especialmente na terceira posição de cada códon. O programa *DAMBE* (Xia e Xie, 2001) foi usado para testar se o Índice de saturação de substituição observado (I_{ss}) foi significativamente menor que o Índice de saturação de substituição crítico ($I_{ss.c}$), conforme proposto por Xia et al. (2003). A saturação dos dados também foi analisada graficamente. A plotagem do número de transições e transversões versus a divergência fornece indicação do nível de saturação das substituições. Gráficos separados foram produzidos com e sem o *outgroup*, para cada região do genoma mitocondrial analisada. O teste de saturação das substituições baseado na estatística I_{ss} , proposto por Xia et al. (2003) e implementado no programa *DAMBE*, também foi realizado separadamente para cada região do DNA mitocondrial analisado no presente estudo.

2.7. Análises filogenéticas

As seqüências nucleotídicas, sob o formato de cromatograma, foram alinhadas e editadas manualmente com auxílio dos programas *Clustal W* (Thompson et al., 1994) e *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1* (Hall, 1999). Em seguida, as seqüências foram analisadas utilizando-se os programas *Modeltest 3.7* (Posada e Crandal, 1998) e *PAUP 4.0 beta 10 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)*; Swofford, 2002) para seleção do melhor modelo evolutivo, empregando-se os procedimentos *Corrected Akaike Information Criterion* (AICc) e *Bayesian Information Criterion* (BIC). O modelo escolhido, por máxima verossimilhança, como o melhor para o ajuste dos dados de ambas as regiões *cytb* e *coxI* foi HKY + G, o qual considera freqüências desiguais de bases.

As análises filogenéticas basearam-se nos algoritmos *neighbor-joining* (“união-de-vizinhos”; NJ) e *maximum-likelihood* (“máximaverossimilhança”; ML). O primeiro estima as relações genealógicas pela minimização das distâncias entre os táxons e dentro da árvore, gerando, assim, um índice de semelhança, enquanto o critério de máxima verossimilhança elege o melhor modelo de substituição nucleotídica que maximiza uma probabilidade, para gerar uma árvore sob a hipótese inferida mais adequada. A construção das árvores *neighbor-joining* e de máxima verossimilhança foi realizada, utilizando os programas *PAUP 4.0 beta 10* e *PhyML 3.0* (Guindon e Gascuel, 2003), respectivamente, usando-se, para isso, o modelo de substituição nucleotídica sugerido pelo *Modeltest 3.7*.

Foram realizadas, também, para a região do gene *coxI*, análises filogenéticas *neighbor-joining* baseadas no modelo evolutivo K2P. O procedimento *neighbor-joining* foi considerado como método padrão de inferências filogenéticas nos estudos de DNA *barcode* (Hebert et al., 2003). A escolha desse algoritmo foi em função de sua alta eficiência e rapidez em análises de espécies em larga escala (Kumar e Gadagkar, 2000). O modelo padrão de substituição molecular usado em estudos de DNA *barcode*, sugerido por Hebert et al. (2003), foi o Kimura-2-parâmetros (K2P; Kimura, 1980). Essa medida de distância é a mais eficaz quando distâncias genéticas são baixas.

Análises de *bootstrap* basearam-se em 10.000 reamostragens para árvores *neighbor-joining* e 1.000 repetições para dendrogramas de máxima verossimilhança.

Em ambos os métodos, foram retidos os valores de *bootstrap* com frequência maior que 50%, os quais foram utilizados para avaliar o suporte para clados individuais dentro de cada árvore. As árvores foram enraizadas pelo critério de grupos externos (*outgroups*; ver item 2.8).

A matriz de distância gerada pelo programa *PAUP 4.0 beta 10*, a partir das sequências nucleotídicas dos exemplares, foi empregada na obtenção dos autovetores pelo programa *DistPCoA* (Legendre e Anderson, 1998). Em seguida, um gráfico de dispersão em coordenadas principais foi confeccionado, após correção das distâncias, proposta por Lingoes (Legendre e Anderson, 1998), utilizando-se os dois primeiros autovetores por meio do programa *STATISTICA 6.0* (StatSoft Inc., 2001).

Também foi realizada análise bayesiana, em que a probabilidade posterior das relações genealógicas foi calculada sob o melhor modelo evolutivo previamente escolhido no *Modeltest 3.7*. Para explorar melhor esse parâmetro, foram utilizadas as Cadeias de Markov e Simulação de Monte Carlo (*MCMC*) por meio do programa *MrBayes 3.0* (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). As probabilidades posteriores foram obtidas após 1.000.000 de gerações para as sequências do gene *coxI* e 2.000.000 de gerações para *cytb*, com amostragem a cada 100 gerações. As gerações anteriores à convergência das cadeias (25%) foram excluídas pela opção *burn-in* e uma árvore consenso acima de 50% foi computada a partir das árvores amostradas depois da convergência.

As matrizes de distância p (porcentagem de diferenças nucleotídicas), assim como as frequências de bases nucleotídicas e números de transições e transversões entre os indivíduos para as duas regiões do genoma mitocondrial, foram calculadas através do programa *Mega 4.0 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Tamura et al., 2007). A tradução das sequências do DNA mitocondrial em aminoácidos também foi realizada a partir do programa *Mega 4.0*.

2.8. Sequências do *GenBank*

Foram selecionadas e analisadas no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) outras sequências de espécies de peixe da ordem Characiformes para servirem de *outgroups* na análise das sequências de piranhas obtidas nesse trabalho. Para garantir maior

confiabilidade, as seqüências foram alinhadas e só os mesmos pares de bases de cada região foram considerados. Ainda, apenas as seqüências disponibilizadas que faziam parte de artigos já publicados em revistas indexadas na base Thompson-ISI (www.webofscience.com) foram selecionadas para as comparações.

Enraizaram-se as árvores geradas com as seqüências da região *cytb*, com as espécies de serrasalmídeos *Piaractus brachypomus*, *Collossoma macropomum*, *Myleus* sp. e *Mylesinus schomburgkii* pelo fato destas espécies terem sido alocadas como táxons próximos de *Serrasalmus* e *Pygocentrus* no estudo de Calcagnotto et al. (2005). Um seqüência de *Pygocentrus nattereri* também estava disponível e foi incluída no estudo. As árvores geradas a partir das seqüências da região *coxI* foram enraizadas com as espécies *Piaractus brachypomus* e *Collossoma macropomum* (Ardura et al., 2010). Os números de acesso no *GenBank* de todas as seqüências utilizadas estão listados na Quadro 3.

Quadro 3 - Acessos das seqüências dos genes mitocondriais *cytb* e *coxI* de caraciformes obtidas no *GenBank*

Espécie	Acesso	Gene	Referência
<i>Pygocentrus nattereri</i>	AY791436	<i>Cytb</i>	Calcagnotto et al., 2005
<i>Piaractus brachypomus</i>	AY791429	<i>Cytb</i>	Calcagnotto et al., 2005
<i>Collossoma macropomum</i>	AY791386	<i>Cytb</i>	Calcagnotto et al., 2005
<i>Myleus</i> sp.	AY791422	<i>Cytb</i>	Calcagnotto et al., 2005
<i>Mylesinus schomburgkii</i>	AY791367	<i>Cytb</i>	Calcagnotto et al., 2005
<i>Piaractus brachypomus</i>	FJ978042	<i>CoxI</i>	Ardura et al., 2010
<i>Collossoma macropomum</i>	FJ418767	<i>CoxI</i>	Ardura et al., 2010

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Citocromo b (*Cytb*)

3.1.1. Padrão de variação da sequência nucleotídica

Com a amplificação do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*), obteve-se um fragmento de, aproximadamente, 1.700 pares de base (pb). No entanto, uma sequência menor foi selecionada para as análises. Essa sequência, de 592 pb, foi escolhida por conter um fragmento referente a uma região parcial do gene *cytb* e também por apresentar melhor qualidade e confiabilidade do seqüenciamento após edição manual. As sequências foram confirmadas, por similaridade, com acessos disponíveis no *GenBank*.

Considerando todas as posições dos códons, a proporção de bases referente à região estudada do gene mitocondrial *cytb* para todos os exemplares de piranhas foi de 25,1% de adenina, 25,8% de timina, 33,4% de citosina e 15,7% de guanina. Esses valores estão próximos aos observados em outros estudos do gene *cytb* para táxons distintos (Farias et al., 2001). A composição nucleotídica da fita codante revelou uma tendência antiguanina, o que é característico dessa região do genoma mitocondrial, como observado por Cantatore et al. (1994). A maioria das alterações foi de uma única substituição nucleotídica, como é característico de regiões codificadoras, sendo que transições foi o tipo mais freqüente ($R = si/sv = 3,416$). As taxas da razão transição/transversão foram de $K_1 = 3,715$ (purinas) e $K_2 = 8,417$ (pirimidinas). O fato de transições predominarem sobre transversões tem sido encontrado em todos os genes do genoma mitocodrial, como revisado por Meyer (1994). Foram identificados 93 sítios variáveis, sendo 86 deles parcimoniosamente informativos.

O teste de saturação conduzido no programa *DAMBE* com sequências *cytb* sem o *outgroup* revelou índice I_{ss} de 0,0506, significativamente menor que o índice $I_{ss.c}$ (0,7178 e 0,4264, para topologias simétricas e assimétricas, respectivamente). O mesmo foi observado para análise com o grupo externo ($I_{ss} = 0,082$; $I_{ss.c} = 0,801$ e 0,766). Esses dados indicam que existe pouca saturação nas sequências e, portanto, estas podem ser usadas para reconstrução filogenética. O gráfico de distância entre as amostras versus as taxas de transição e transversão corroboram esses dados (Figura 2).

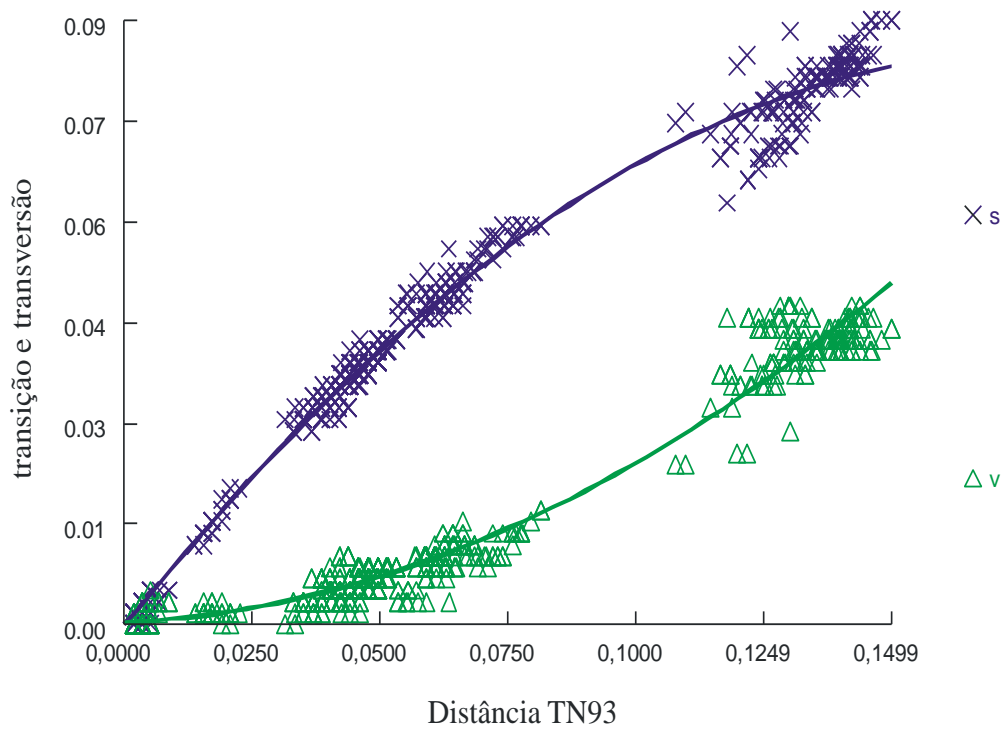
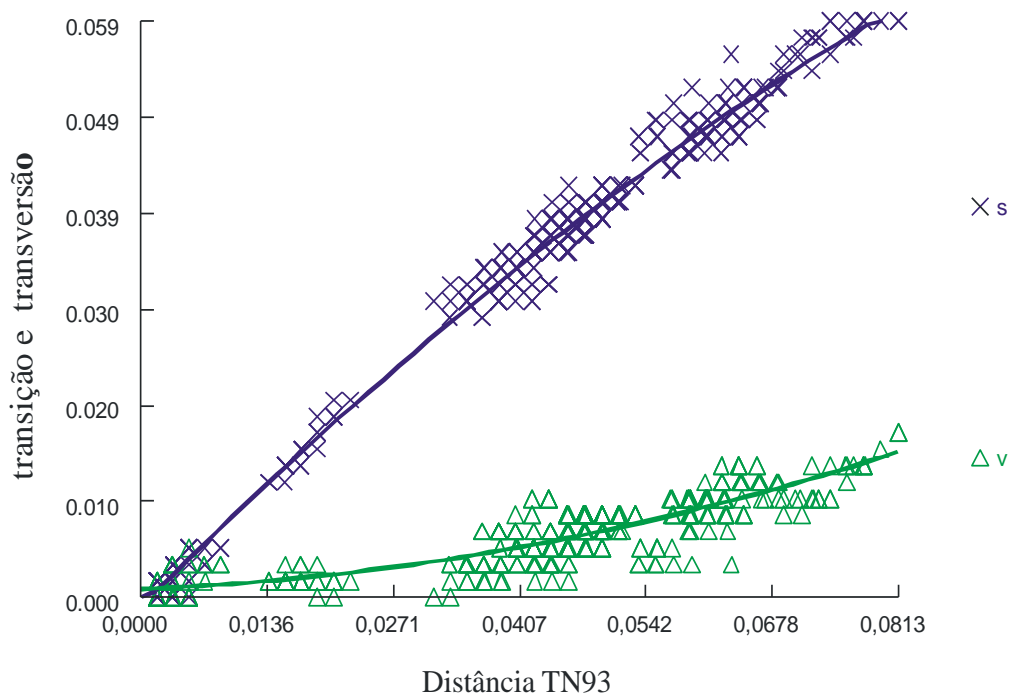


Figura 2 - Gráficos de transição (s) e transversão (v) versus distância de Tamura e Nei (1993) de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* obtidos com sequências do gene mitocondrial citocromo b. Gráfico superior: sem o *outgroup*; gráfico inferior: com o *outgroup*.

Grande parte das substituições ocorreu na terceira posição dos códons. Alterações na terceira base geralmente não resultam em substituições de aminoácidos e, portanto, estas regiões acumulam mais mutações do que as primeiras e segundas bases dos códons, uma vez que estão sob menos pressões seletivas. No entanto, houve algumas exceções, com alterações ocorrendo na primeira base: todos os indivíduos de *S. eigenmanni* apresentaram substituições de timina e adenosina nas posições 106 e 442, respectivamente, e em apenas um indivíduo (EgmGR49) ocorreu uma substituição de adenosina na posição 454. *Serrasalmus marginatus* teve uma substituição de timina no sítio 178 e *S. maculatus*, da bacia do rio Paraná-Paraguai, apresentou uma substituição de adenina na posição 442.

Conforme pode ser observado no Quadro 4, o alinhamento *Clustal W* das sequências do gene mitocondrial *cytb* revelou 93 sítios polimórficos, que foram distribuídos em 30 haplótipos. Dos haplótipos identificados, quatro foram de *Pygocentrus nattereri*, quatro de *P. piraya*, cinco de *Serrasalmus marginatus*, três de *S. rhombeus*, três de *S. eigenmanni*, um de *S. brandtii*, dois de *Serrasalmus* sp. e oito de *S. maculatus*. No entanto, pode-se observar que um haplótipo de *Serrasalmus* sp. foi idêntico ao haplótipo de *S. maculatus* do rio Tocantins e o outro diferiu em apenas uma base nucleotídica. A maior diversidade haplotípica foi encontrada em *S. maculatus*.

Dois polimorfismos nucleotídicos foram associados apenas à *P. nattereri*, enquanto um foi exclusivo de *P. piraya*. Para *S. marginatus*, duas bases permitiram separar essa espécie das demais, cinco polimorfismos foram exclusivos de *S. eigenmanni* e seis ocorreram apenas em *S. brandtii*. Nenhuma base espécie-específica foi detectada exclusivamente para *S. rhombeus*. Foi possível verificar que as populações de *S. maculatus* do alto rio Paraná e do rio Manso (bacia hidrográfica Paraná-Paraguai) foram discriminadas das outras espécies e, também, da população atualmente descrita como *S. maculatus* do rio Tocantins por quatro bases nucleotídicas. Por outro lado, quatro polimorfismos ocorreram exclusiva e simultaneamente nos espécimes de *Serrasalmus* sp. e de *S. maculatus* do rio Tocantins. Finalmente, um polimorfismo apareceu apenas nos indivíduos de todas as populações de *S. maculatus* e *Serrasalmus* sp.

Neste trabalho verificou-se que *Serrasalmus maculatus* das bacias hidrográficas Paraná-Paraguai e Tocantins são distintos geneticamente e, portanto, devem ser tratadas como espécies diferentes. Vinte polimorfismos separaram a população dos rios Paraná-Paraguai da população do rio Tocantins, conforme visto no capítulo anterior.

Quando considerada uma única espécie, houve polimorfismos nucleotídicos associados a uma determinada localidade. Dezoito polimorfismos ocorreram em todos os espécimes de *Pygocentrus nattereri* da bacia do rio Tocantins, mas não na população do rio Manso. Já para *Serrasalmus maculatus*, apenas uma substituição nucleotídica diferenciou a população do alto rio Paraná da população do rio Manso. O mesmo não foi observado nas populações de *S. marginatus* do alto rio Paraná e do rio Manso.

3.1.2. Polimorfismo aminoacídico

Os 592 pb obtidos com o seqüenciamento da região *cytb* corresponderam a 196 aminoácidos, representados no Quadro 5. Foram identificados 15 haplótipos aminoacídicos, sendo um de *Pygocentrus nattereri*, dois de *P. piraya*, um de *Serrasalmus marginatus*, um de *S. rhombeus*, dois de *S. eigenmanni*, um de *S. brandtii*, um de *Serrasalmus* sp. e cinco de *S. maculatus*. Porém, os haplótipos aminoacídicos de *S. rhombeus*, *S. marginatus*, *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* do rio Tocantins foram similares.

O gênero *Pygocentrus* diferenciou-se do gênero *Serrasalmus* por um polimorfismo aminoacídico (posição 40). Houve um polimorfismo exclusivo de *P. piraya* (posição 25) e outro exclusivo de *S. brandtii* (posição 51). As populações de *S. maculatus* diferenciaram-se entre si por um polimorfismo aminoacídico (posição 148): todos os indivíduos coletados na bacia hidrográfica Paraná-Paraguai apresentaram uma isoleucina, enquanto os espécimes coletados no rio Tocantins, além dos indivíduos identificados como *Serrasalmus* sp., possuem uma valina. Outros aminoácidos exclusivos foram detectados em espécimes isolados, como pode ser visualizado no Quadro 5.

Quadro 5 - Polimorfismo aminoacídico das sequências do gene mitocondrial citocromo b (592pb) do DNA mitocondrial de espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Haplótipos: Hapl-Ntr = *P. nattereri*; Hapl-Pry = *P. piraya*; Hapl-Mgn = *S. marginatus*; Hapl-Rmb = *S. rhombeus*; Hapl-Egm = *S. eigenmanni*; Hapl-Bdt = *S. brandtii*; Hapl-Srs = *Serrasalmus* sp.; Hapl-Smc = *S. maculatus*

Espécie	Amostras	Localidade	Haplótipos	11111
				24545567
				50181259
<i>P. nattereri</i>	NtrTO19, 21, 24, 28, 30-32, NtrMS01, 02, 10, 11, 14, 18, 24	Rios Tocantins/ Manso	Hapl-Ntr-I	AICVTANH
<i>P. piraya</i>	PrySF499-501	Rio São Francisco	Hapl-Pry-I	T G . .
<i>P. piraya</i>	PrySF502, 503	Rio São Francisco	Hapl-Pry-II	T
<i>S. marginatus</i>	MgnMS33, 35, 45, 48, 50, LG03, 07, RB18, PL06, 08, 536-538, 609	Rios Manso/ Paraná	Hapl-Mgn-I	. M
<i>S. rhombeus</i>	RmbTO02, 04, 05, 07, 09, 11, 13	Rio Tocantins	Hapl-Rmb-I	. M
<i>S. eigenmanni</i>	EgmGR39, 40, 45, 46, 50	Rio Tocantins	Hapl-Egm-I	. M . I
<i>S. eigenmanni</i>	EgmGR49	Rio Tocantins	Hapl-Egm-II	. M . I . T . . .
<i>S. brandtii</i>	BdtSF325-327	Rio São Francisco	Hapl-Bdt-I	. MWI
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO38, 56, 57, 59-62	Rio Tocantins	Hapl-Srs-I	. M
<i>S. maculatus</i>	SmcTO65, 66, 69, 70, 73, 74, 79-82	Rio Tocantins	Hapl-Smc-I	. M
<i>S. maculatus</i>	SmcMS51-53, 55, 58, 61, 66, 68, 69, SmcLG05, 06, 11, 12, RB01, 08, PL04, 10, 11, 12, 15	Rios Manso/ Paraná	Hapl-Smc-II	. M . I
<i>S. maculatus</i>	SmcLG01	Rio Paraná	Hapl-Smc-III	. M . I . . . K .
<i>S. maculatus</i>	SmcRB04	Rio Paraná	Hapl-Smc-IV	. M . I . . . KQ
<i>S. maculatus</i>	SmcRB07	Rio Paraná	Hapl-Smc-V	. M . IN . . . Q

3.1.3. Análises filogenéticas

A divergência genética entre as espécies e entre os haplogrupos de piranhas foi examinada por meio de análises filogenéticas. A partir do modelo evolutivo HKY + G, considerado como o que melhor explicou os dados das sequências *cytb* pelo programa *Modeltest 3.7*, com ambos os critérios *Akaike* (AICc) e *Bayesiano* (BIC), e dos parâmetros Nst = 2; TRatio = 5.1482; Rates = gamma, Shape = 0.1348; Pinvar = 0, foram construídas árvores sob os critérios *neighbor-joining* (Figura 3) e máxima verossimilhança (Figura 4).

Ambos dendrogramas *neighbor-joining* e de máxima verossimilhança (Figuras 3 e 4) foram congruentes na separação das espécies e também na divisão dos clados. No entanto, pequenas discrepâncias nas relações entre os táxons foram observadas.

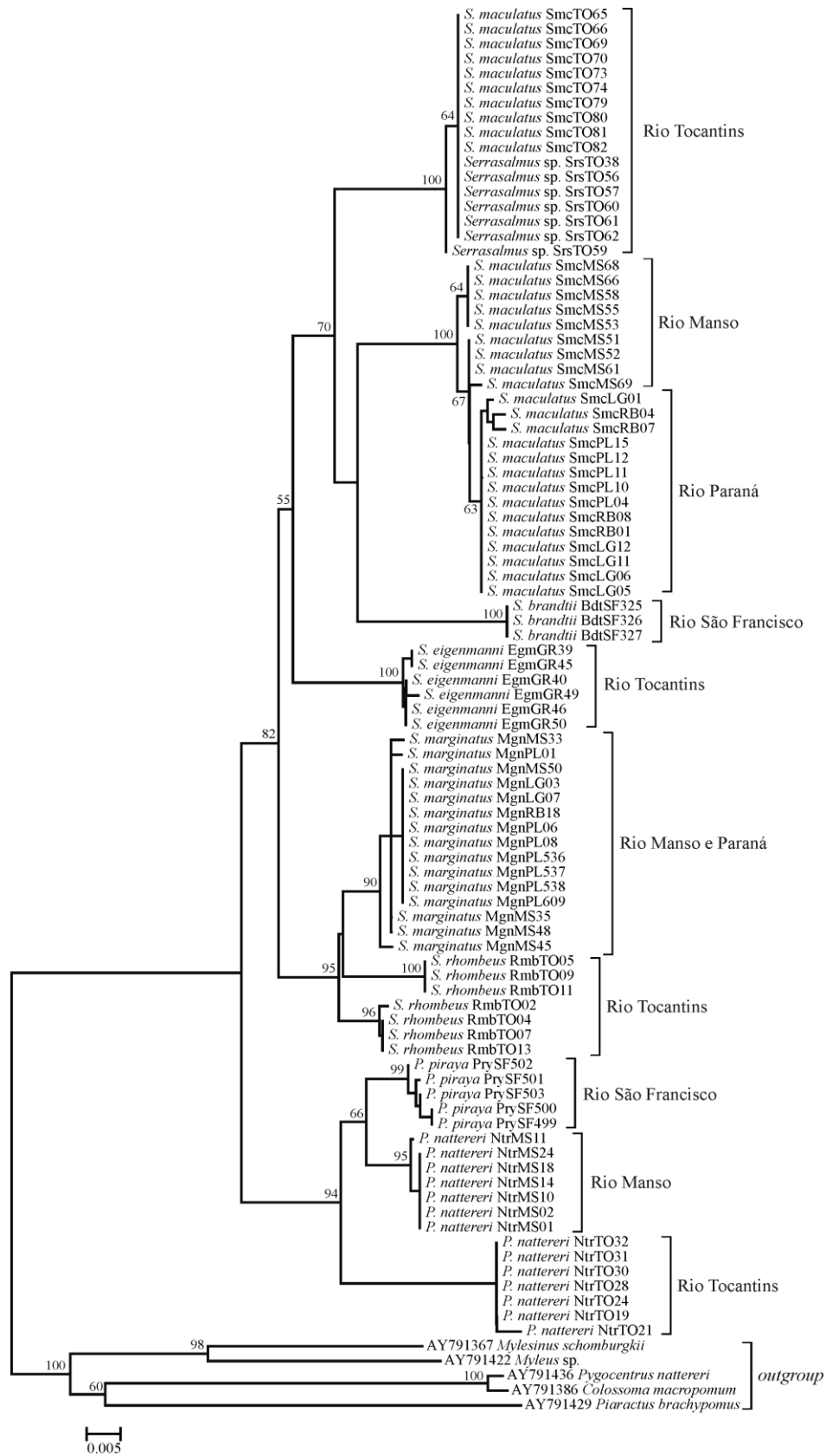


Figura 3 - Árvore filogenética *neighbor-joining* gerada a partir da sequência parcial do gene citocromo b de espécies de piranhas, obtida com o modelo HKY + G. Números nas ramificações da árvore representam valores de *bootstrap* baseados em 10.000 reamostragens.

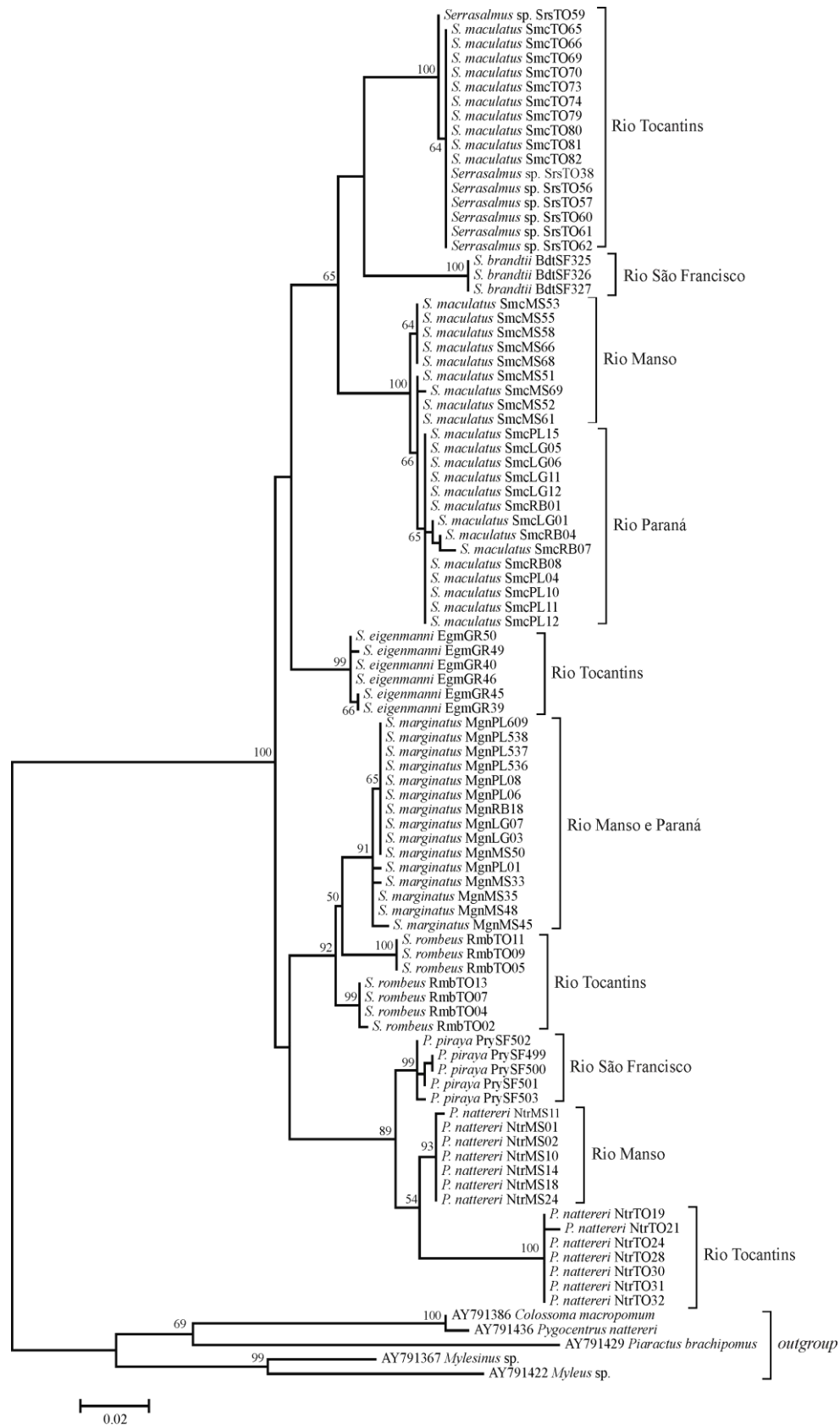


Figura 4 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança gerada a partir da sequência parcial do gene citocromo b de espécies de piranhas, obtida com o modelo HKY + G. Números nas ramificações da árvore representam valores de *bootstrap* baseados em 1.000 reamostragens.

As sequências do gene mitocondrial citocromo b foram eficientes na discriminação da maioria das espécies, com altos valores de *bootstrap* apoiando a separação dos clados. A única exceção foi *Serrasalmus* sp., que agrupou-se com espécimes de *S. maculatus* do rio Tocantins. Todas as espécies do gênero *Serrasalmus* formaram um grande grupo monofilético no dendrograma *neighbor-joining* (NJ). Entretanto, o monofiletismo desse gênero não foi identificado no dendrograma de máxima verossimilhança (ML); neste caso, o grupo foi definido como parafilético. Já as espécies do gênero *Pygocentrus* constituíram um clado monofilético em ambos os dendrogramas.

Com relação às espécies do gênero *Serrasalmus*, pode-se observar que *S. marginatus* e *S. rhombeus* foram agrupados num clado maior, que foi dividido em três subgrupos, sendo um referente à espécie *S. marginatus*, e os outros dois à *S. rhombeus*. Esse clado ficou alocado como irmão do agrupamento formado por *S. eigenmanni*, *S. brandtii*, *S. maculatus* e *Serrasalmus* sp., no dendrograma *neighbor-joining*. *Serrasalmus eigenmanni*, por sua vez, foi definido como grupo irmão das três últimas espécies e *S. brandtii* foi alocada como irmã de *S. maculatus* da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai. No entanto, no dendrograma de máxima verossimilhança, as relações entre os táxons de *Serrasalmus* foram ligeiramente diferentes. Foram formados dois grandes clados. O primeiro, constituído por *S. marginatus* e *S. rhombeus*, além das espécies do gênero *Pygocentrus*; e o segundo, que incluiu apenas as espécies *S. eigenmanni*, *S. brandtii*, *S. maculatus* e *Serrasalmus* sp. Nesse caso, *S. brandtii* foi identificada como irmã do clado formado por *S. maculatus* e *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins.

Dentro do gênero *Pygocentrus*, as relações entre os táxons também não foram totalmente concordantes entre si. Enquanto no dendrograma de máxima verossimilhança, *P. nattereri* foi considerado um grupo monofilético, no dendrograma *neighbor-joining* a espécie *P. piraya* foi alocada dentro do clado constituído por espécimes de *P. nattereri*.

Observa-se claramente que a espécie *Pygocentrus nattereri* foi dividida em dois subgrupos menores, correspondentes às populações do rio Tocantins (NtrTO), na parte mais basal, e do rio Manso (NtrMS), na porção superior. Dentro de cada

haplogrupo, observou-se baixa variabilidade genética, com apenas dois haplótipos ocorrendo no rio Tocantins e outros dois no rio Manso. Entretanto, a distância genética entre as populações dessas localidades foi comparativamente alta (distância $p = 3,1\%$; Quadro 6).

A amostra de *P. nattereri* obtida no *GenBank* referente ao artigo de Calcagnotto et al. (2005) apresentou grande distância genética quando comparada aos espécimes de *P. nattereri* do presente trabalho (Figuras 3 e 4). Esse exemplar agrupou-se ao clado constituído pelo *outgroup*, ficando mais próxima do tambaqui *Colossoma macropomum* do que dos outros indivíduos de *P. nattereri*. Esse resultado é incongruente com o obtido por Calcagnotto et al. (2005), em que o clado formado por *Pygocentrus* e *Serrasalmus* foi apoiado por um alto valor de *bootstrap*. É possível ter ocorrido um erro durante o depósito da sequência no *GenBank*.

Quadro 6 - Valores médios de distância p , em porcentagem, entre (abaixo da diagonal) e dentro (diagonal) de populações de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, obtidos a partir de seqüências do gene mitocondrial citocromo b. **1** = *P. nattereri*, rio Tocantins; **2** = *P. nattereri*, rio Manso; **3** = *P. piraya*, rio São Francisco; **4** = *S. maculatus*, rio Tocantins; **5** = *S. maculatus*, rio Manso; **6** = *S. maculatus*, alto rio Paraná; **7** = *S. marginatus*, rio Manso; **8** = *S. marginatus*, alto rio Paraná; **9** = *S. rhombeus*, rio Tocantins, grupo 1 (RmbTO02, 04, 07, 13); **10** = *S. rhombeus*, rio Tocantins, grupo 2 (RmbTO05, 09, 11); **11** = *S. eigenmanni*, rio Tocantins; **12** = *S. brandtii*, rio São Francisco; **13** = *Serrasalmus* sp., rio Tocantins

Espécie/ População	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0,1												
2	3,1	0,0											
3	3,8	1,6	0,2										
4	6,6	5,7	5,8	0,0									
5	6,8	5,6	5,6	3,7	0,0								
6	7,0	5,8	5,8	3,9	0,4	0,2							
7	6,0	4,8	4,5	4,0	4,5	4,7	0,3						
8	6,1	4,8	4,6	4,1	4,6	4,8	0,2	0,1					
9	5,7	4,5	4,1	3,9	4,2	4,4	1,5	1,6	0,1				
10	6,0	4,8	4,6	4,2	5,1	5,3	2,0	2,0	1,9	0,0			
11	5,9	4,6	4,7	4,3	4,0	4,2	3,4	3,5	3,4	4,2	0,1		
12	6,8	6,4	6,6	3,9	3,7	3,9	5,1	5,2	5,4	5,9	4,3	0,0	
13	6,6	5,7	5,8	0,0	3,7	3,9	3,9	4,0	3,9	4,2	4,3	3,9	0,0

O isolamento entre populações do rio Tocantins e da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai foi evidenciado também para a espécie *Serrasalmus maculatus*. O clado formado por indivíduos do alto rio Paraná e do rio Manso (SmcPL/LG/RB e SmcMS, respectivamente) foram separados da população da bacia do rio Tocantins (SmcTO) por um consistente valor de *bootstrap* (70/65). Entretanto, não houve separação significativa entre os espécimes da planície de inundação do alto rio Paraná e os exemplares do rio Manso. Isso foi observado tanto para a espécie *Serrasalmus maculatus* quanto para *S. marginatus*.

Esses resultados foram corroborados pelos valores médios de distância p. A população de *Serrasalmus maculatus* de Tocantins divergiu em 3,7% da população do rio Manso e em 3,9% da população do alto rio Paraná. Valores dessa magnitude foram encontrados também entre espécies diferentes (Quadro 7). Por outro lado, a diferenciação entre *S. maculatus* do rio Manso e *S. maculatus* do alto rio Paraná foi de apenas 0,4%, uma diferença de até oito vezes menor do que a encontrada para a população do rio Tocantins. O valor médio de distância p identificado entre as duas populações de *S. marginatus* também foi bastante pequena (0,2%; Quadro 6).

Todos os exemplares da espécie identificada como *Serrasalmus* sp. do rio Tocantins (SrsTO) foram alocados dentro do clado formado por *Serrasalmus maculatus* do rio Tocantins (SmcTO), com haplótipo idêntico ao encontrado para essa última espécie, com exceção apenas de um indivíduo, SrsTO59. O alto valor de *bootstrap* e o valor nulo de distância genética entre as duas espécies (Quadro 6) corroboraram esse resultado.

Como dito anteriormente, os exemplares de *Serrasalmus rhombeus* da bacia do rio Tocantins foram separados em dois clados (grupo 1 formado pelos exemplares RmbTO02, 04, 07, 13; e grupo 2, formado por RmbTO05, 09, 11) por um valor médio de distância p de 1,9%. Valores dessa magnitude foram identificados também entre *Serrasalmus rhombeus* e *S. marginatus* (distância p = 1,8%, Quadro 7). O grupo 2 apresentou-se mais distante geneticamente de *S. marginatus* do que o grupo 1 (distância p = 2,0 e 1,5-1,6%, respectivamente, Quadro 6). A proximidade genética entre essas duas espécies também pode ser visualizada nos dendrogramas das Figuras 3 e 4.

Quadro 7 - Valores médios de distância p, em porcentagem, obtidos a partir de sequências do gene mitocondrial citocromo b entre e dentro de espécies de piranhas do gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. TO = rio Tocantins, MS = rio Manso, PR = alto rio Paraná, SF = rio São Francisco

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>P. nattereri</i> - TO e MS	1,7								
2. <i>P. piraya</i> - SF	2,7	0,2							
3. <i>S. maculatus</i> - TO	6,2	5,8	0,0						
4. <i>S. maculatus</i> - MS e PR	6,3	5,8	3,9	0,3					
5. <i>S. marginatus</i> - MS e PR	5,5	4,6	4,0	4,7	0,2				
6. <i>S. rhombeus</i> - TO	5,2	4,3	4,1	4,7	1,8	1,1			
7. <i>S. eigenmanni</i> - TO	5,2	4,7	4,3	4,1	3,5	3,7	0,1		
8. <i>S. brandtii</i> - SF	6,6	6,6	3,9	3,9	5,2	5,6	4,3	0,0	
9. <i>Serrasalmus</i> sp. - TO	6,2	5,8	0,0	3,8	4,0	4,0	4,3	3,9	0,0

Dentro de cada um dos clados menores, denominados como NtrTO (*P. nattereri*, rio Tocantins), NtrTMS (*P. nattereri*, rio Manso), PrySF (*P. piraya*, rio São Francisco), EgmGR (*S. eigenmanni*, rio Tocantins), SmcTO (*S. maculatus*, rio Tocantins), SmcMS (*S. maculatus*, rio Manso), SmcPR (*S. maculatus*, alto rio Paraná), BdtSF (*S. brandtii*, rio São Francisco), MgnMS (*S. marginatus*, rio Manso), MgnPR (*S. marginatus*, alto rio Paraná), RmbTO1 (*S. rhombeus*, rio Tocantins, grupo 1), RmbTO2 (*S. rhombeus*, rio Tocantins, grupo 2) e SrsTO (*Serrasalmus* sp., rio Tocantins), observou-se baixa variação genética (Quadro 6). Contudo, se for considerado as espécies sem distinção de localidades, com exceção apenas de *S. maculatus*, os valores intrapopulacionais mais altos de distância p foram detectados dentro de *Pygocentrus nattereri* e de *Serrasalmus rhombeus* (Quadro 7).

O cálculo da distância p para a região *cytb* do mtDNA revelou um valor médio de 5,5% entre os gêneros *Pygocentrus* e *Serrasalmus*, de maneira que dentro do gênero *Pygocentrus*, o valor de distância p foi de 2,1%, enquanto para *Serrasalmus* esse valor foi maior (3,4%), provavelmente, pelo maior número de espécies analisadas para esse gênero.

As distâncias genéticas e o agrupamento das espécies e/ou populações podem ser visualizados no gráfico de dispersão gerado a partir da matriz de distância HKY + G, em que os valores das distâncias, emparelhadas em escalas dimensionais, geraram os respectivos valores de autovetores (Figura 5). Os mesmos agrupamentos identificados nos dendrogramas *neighbor-joining* e de máxima verossimilhança foram detectados no gráfico de dispersão.

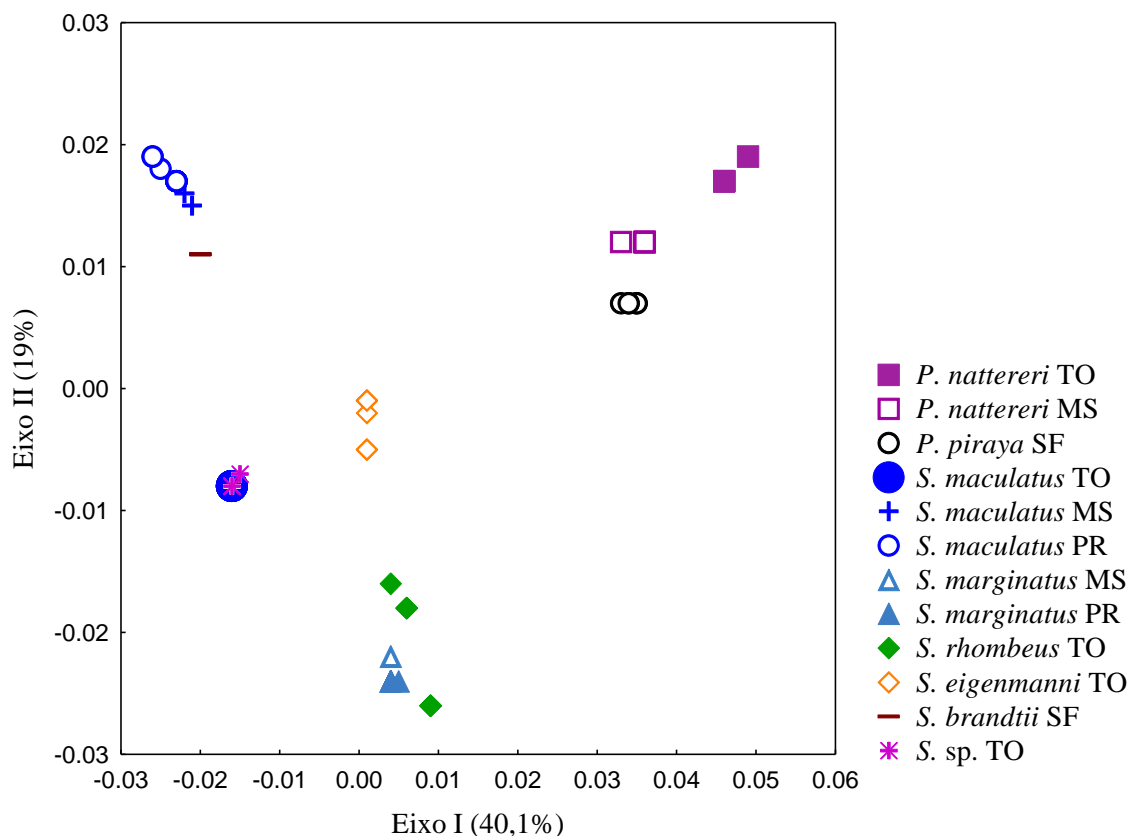


Figura 5 - Gráfico de dispersão em coordenadas principais 2D de espécies de piranhas, baseado na distância HKY + G do gene citocromo b. TO = rio Tocantins, MS = rio Manso, PR = alto rio Paraná, SF = rio São Francisco.

Com relação às probabilidades *a posteriori*, a árvore gerada pela inferência bayesiana (Figura 6) também demonstrou visualmente as distâncias entre as espécies e suas respectivas populações observadas nos dendrogramas NJ e ML e no gráfico de dispersão. No entanto, as relações entre os táxons obtidas na análise bayesiana foram mais próximas ao observado no dendrograma ML. Altos valores de probabilidades posteriores sustentaram os clados formados.

AY791429 *P. brachypomus*

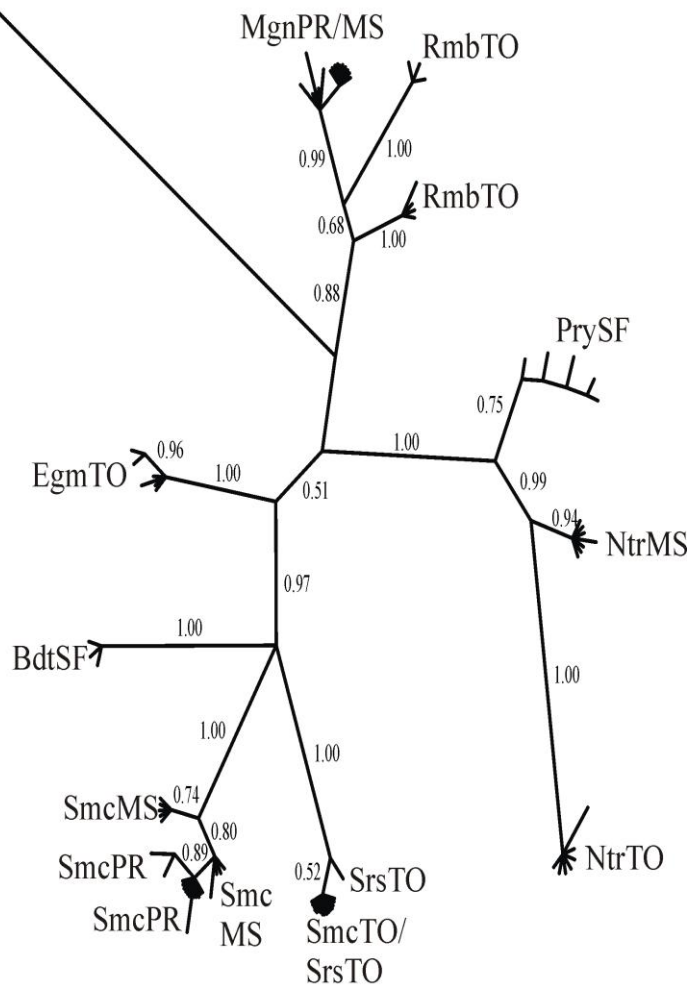


Figura 6 - Árvore bayesiana gerada sob as simulações das Cadeias de Markov e Simulação de Monte Carlo (MCMC) obtida a partir das sequências parciais do gene citocromo b de diferentes espécies de piranha dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, segundo o modelo de substituição nucleotídica HKY + G. Os valores nas ramificações correspondem à porcentagem da probabilidade posterior das relações genealógicas. Vinte e cinco por cento das gerações iniciais foram descartadas. Mgn = *S. marginatus*; Rmb = *S. rhombeus*; Egm = *S. eigenmanni*; Bdt = *S. brandtti*; Smc = *S. maculatus*; Srs = *Serrasalmus* sp.; Ntr = *P. nattereri*; Pry = *P. piraya*; TO= rio Tocantins; PR= alto rio Paraná; MS= rio Manso; SF= rio São Francisco.

3.2. Citocromo c oxidase subunidade I (*CoxI*)

3.2.1. Padrão de variação da sequência nucleotídica

Para todas as espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus* foi amplificado e sequenciado um fragmento de 704 pb do gene citocromo c oxidase subunidade I (*coxI*). No entanto, após alinhamento e edição manual, utilizou-se uma sequência de 550 pb, devido à maior porcentagem de confiança e qualidade encontrada nesse intervalo. As sequências foram identificadas com acessos disponíveis no *GenBank*, por similaridade.

A análise das sequências correspondentes ao gene mitocondrial *coxI* revelou composição média das bases nucleotídicas de A = 22,7%, T = 27,8%, C = 31,6% e G = 17,9%, com valores muito próximos aos encontrados em outros trabalhos (Ward e Holmes, 2007; Ward et al., 2005). As substituições foram de apenas uma base nucleotídica e sem ocorrência de *indels* (inserções-deleções). O tipo mais freqüente de substituição foi transição, com relação R (si/sv) = 8,6. As taxas da razão transição/transversão foram de $K_1 = 23,381$ (purinas) e $K_2 = 12,601$ (pirimidinas). A grande maioria das substituições nucleotídicas se deu na terceira base de cada códon. No entanto, ocorreram modificações na primeira base dos códons de todos os exemplares das espécies de *Serrasalmus* sp. e de *S. maculatus* do rio Tocantins (timina, sítios 135 e 480), *S. rhombeus* (grupo 2: RmbTO05, 09, 11 e 12; adenina, posição 138) e *P. nattereri* do rio Manso (timina, sítio 534). Foram identificados 70 sítios variáveis, sendo que 68 deles foram parcimoniosamente informativos.

Os resultados do teste de saturação, obtidos pelo programa *DAMBE*, revelaram que as sequências do gene *coxI* das espécies de piranhas analisadas estão pouco saturadas. Os gráficos de distância versus as taxas de transição e transversão (Figura 7) revelaram correlação quase linear. Os índices de saturação corroboraram esse resultado. O I_{ss} para análises sem o *outgroup* (0,0407) foi significativamente menor que o $I_{ss.c}$ (0,7183 e 0,4835, para topologias simétricas e assimétricas, respectivamente). O mesmo foi identificado para análises com o *outgroup* ($I_{ss} = 0,0736$; $I_{ss.c} = 0,7192$ e 0,4714).

O Quadro 8 mostra o alinhamento das sequências do gene mitocondrial *coxI* realizado por meio do programa *Clustal W*.

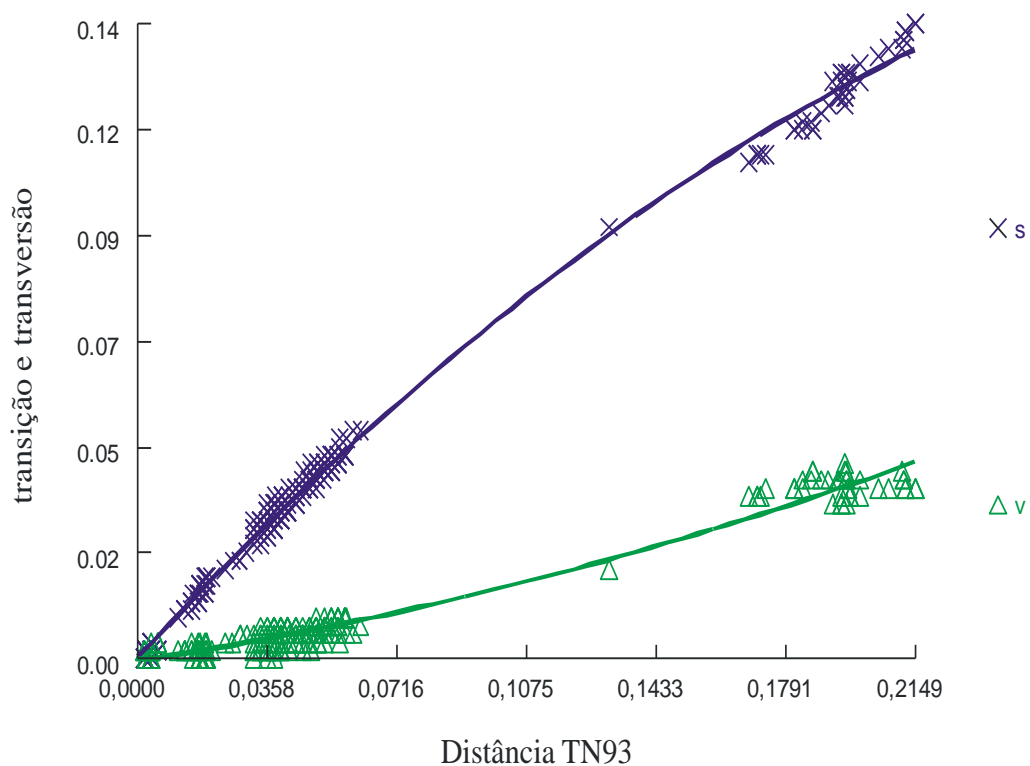
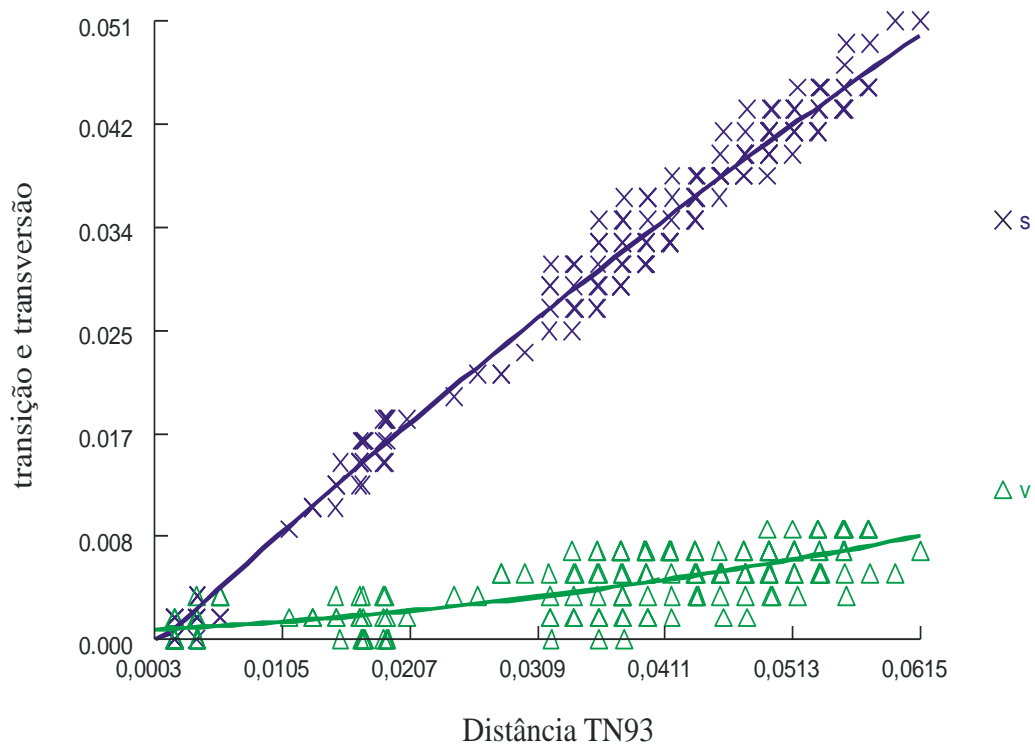


Figura 7 - Gráficos de transição (s) e transversão (v) versus distância de Tamura e Nei (1993) de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* obtidos com sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I, sem (superior) e com (inferior) *outgroup*.

Foram detectados 70 sítios variáveis, distribuídos em 21 haplótipos, de maneira que dois foram correspondentes aos espécimes de *Pygocentrus nattereri*, três de *Serrasalmus marginatus*, quatro de *S. rhombeus*, um de *S. eigenmanni*, um de *S. brandtii*, um de *Serrasalmus* sp. e nove de *S. maculatus*. No entanto, os haplótipos identificados nas populações de *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* da bacia do rio Tocantins foram exatamente os mesmos. Assim como para as sequências do gene *cytb*, *S. maculatus* apresentou a maior diversidade haplotípica, com nove haplótipos detectados entre as diferentes populações das bacias do alto rio Paraná, rio Manso e rio Tocantins.

Cinco polimorfismos nucleotídicos exclusivos de *Pygocentrus nattereri* permitiram sua diferenciação com as demais espécies. Uma base ocorreu somente nos indivíduos de *Serrasalmus marginatus*. A discriminação de *S. eigenmanni* foi possível a partir de cinco polimorfismos nucleotídeos espécie-específicos, assim como para *S. brandtii*, que também apresentou cinco nucleotídeos exclusivos da espécie. Entretanto, para *S. rhombeus*, nenhum polimorfismo exclusivo foi detectado. Apenas uma substituição nucleotídica foi exclusiva de todas as populações de *S. maculatus* juntamente com exemplares de *Serrasalmus* sp. De modo semelhante ao produzido pelas sequências nucleotídicas do gene *cytb*, foi verificada separação das populações de *S. maculatus* do alto rio Paraná e do rio Manso, da população de Tocantins e das outras espécies por quatro polimorfismos nucleotídeos, além de seis bases que ocorreram exclusivamente na população de *S. maculatus* da bacia do rio Tocantins juntamente com espécimes de *Serrasalmus* sp.

Considerando-se espécies isoladamente, foi observada a ocorrência de alguns nucleotídicos específicos de uma determinada localidade. Sete polimorfismos nucleotídicos ocorreram apenas na população do rio Tocantins de *Pygocentrus nattereri*. Para *Serrasalmus maculatus*, três bases nucleotídicas foram exclusivas da população do rio Manso e cinco ocorreram apenas na população do alto rio Paraná, enquanto somente um polimorfismo separou as populações do alto rio Paraná e do rio Manso de *S. marginatus* (Quadro 8).

3.2.2. Polimorfismo aminoacídico

Um total de 182 aminoácidos correspondentes aos 550 pb obtidos com o sequenciamento da região *coxI* estão resumidos na Quadro 9. Todas as espécies apresentaram mesmo perfil de sequência aminoacídica, com exceção do grupo 1 de *S. rhombeus* (RmbTO05, 09, 11, 12) e de apenas um indivíduo de *S. marginatus*.

Quadro 9 - Polimorfismo aminoacídico das sequências do gene citocromo c oxidase I (550pb) do DNA mitocondrial de espécies dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Haplótipos: Hapl-Ntr = *P. nattereri*, Hapl-Mgn = *S. marginatus*, Hapl-Rmb = *S. rhombeus*, Hapl-Egm = *S. eigenmanni*, Hapl-Bdt = *S. brandtii*, Hapl-Srs = *Serrasalmus* sp., Hapl-Smc = *S. maculatus*

Espécies	Amostras	Localidade	Haplótipos	1 4 7 6 5
<i>P. nattereri</i>	NtrTO19, 21, 22, 24, 30, NtrMS01, 02, 10, 11	Rios Tocantins/ Manso	Hapl-Ntr-I	V D
<i>S. marginatus</i>	MgnMS33, 45, 48, LG03, 07, RB14, PL536-538, 609	Rios Manso/ Paraná	Hapl-Mgn-I	. .
<i>S. marginatus</i>	MgnPL06	Rio Paraná	Hapl-Mgn-II	. E
<i>S. rhombeus</i>	RmbTO04, 07, 13	Rio Tocantins	Hapl-Rmb-I	. .
<i>S. rhombeus</i>	RmbTO 05, 09, 11, 12	Rio Tocantins	Hapl-Rmb-II	I .
<i>S. eigenmanni</i>	EgmGR39, 40, 46, 49, 50	Rio Tocantins	Hapl-Egm-I	. .
<i>S. brandtii</i>	BdtSF325-328	Rio São Francisco	Hapl-Bdt-I	. .
<i>Serrasalmus</i> sp.	SrsTO38, 56, 57, 59-61	Rio Tocantins	Hapl-Srs-I	. .
<i>S. maculatus</i>	SmcTO65, 66, 69, 70, 73, 74, 80, SmcMS51-53, 55-58, 61, 69, SmcLG01, 06, 11, RB01, 02, 04, 06, 07, 08, PL04, 09-12, 14, 15	Rios Tocantins/ Manso/ Paraná	Hapl-Smc-I	. .

3.2.3. Análises filogenéticas

A seleção do modelo de substituição nucleotídica HKY + G para as sequências do gene *coxI* foi obtida pelo procedimento *Bayesian Information Criterion* (BIC). Este modelo tem a maior probabilidade de explicar as substituições nucleotídicas da região *coxI* encontrada para as espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. A construção das árvores filogenéticas *neighbor-joining* (Figura 8) e de máxima verossimilhança (Figura 9) foi baseada nos parâmetros Nst = 6; Rmat = (1,0000; 7,2077; 0,0271; 0,0271; 7,2077); Rates = gamma, Shape = 0,1726; Pinvar = 0.

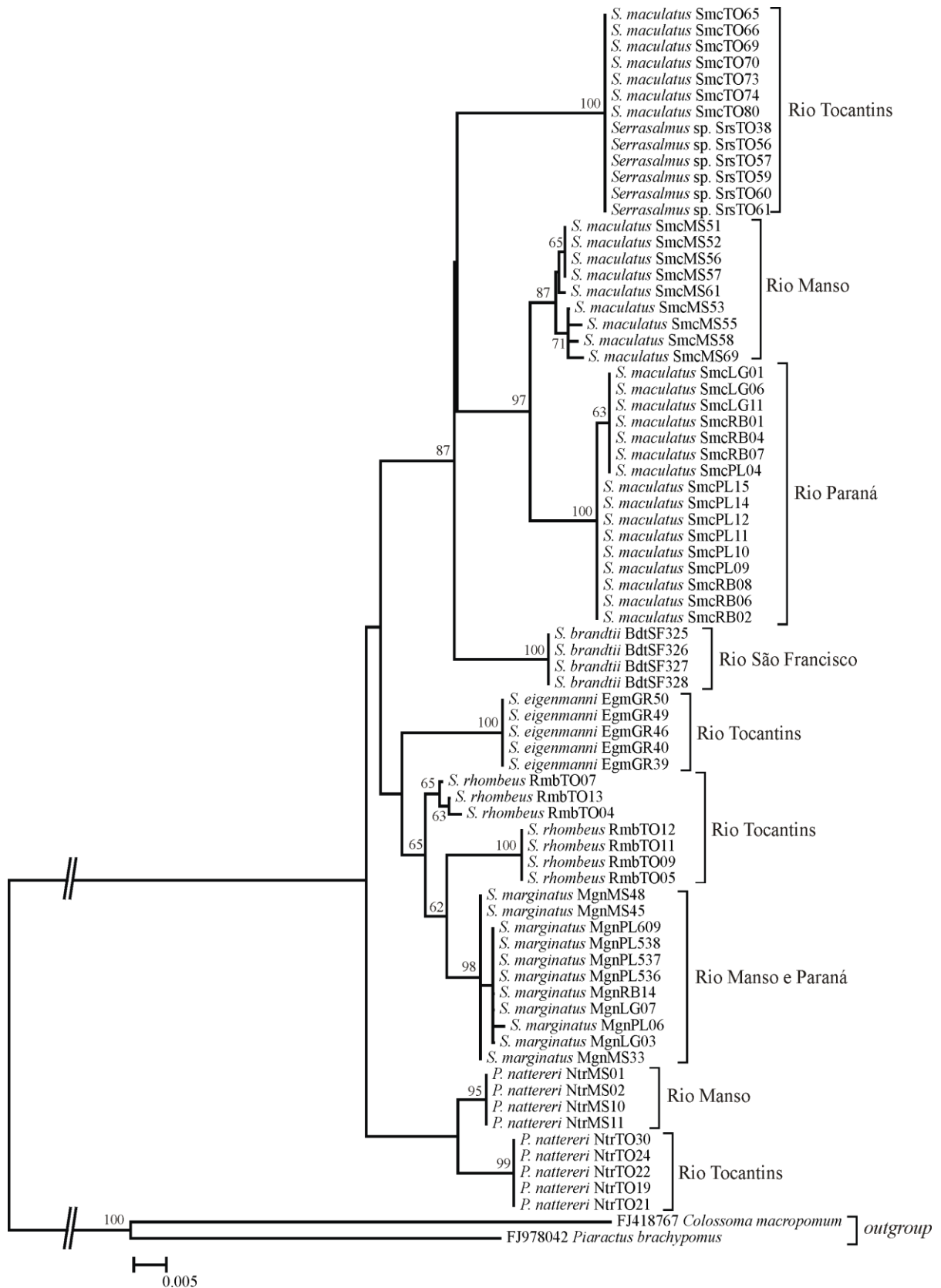


Figura 8 - Árvore filogenética *neighbor-joining* gerada a partir da sequência parcial do gene citocromo c oxidase I de diferentes espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, obtida com o modelo HKY + G. Números nas ramificações da árvore representam valores de *bootstrap* baseados em 10.000 reamostragens.

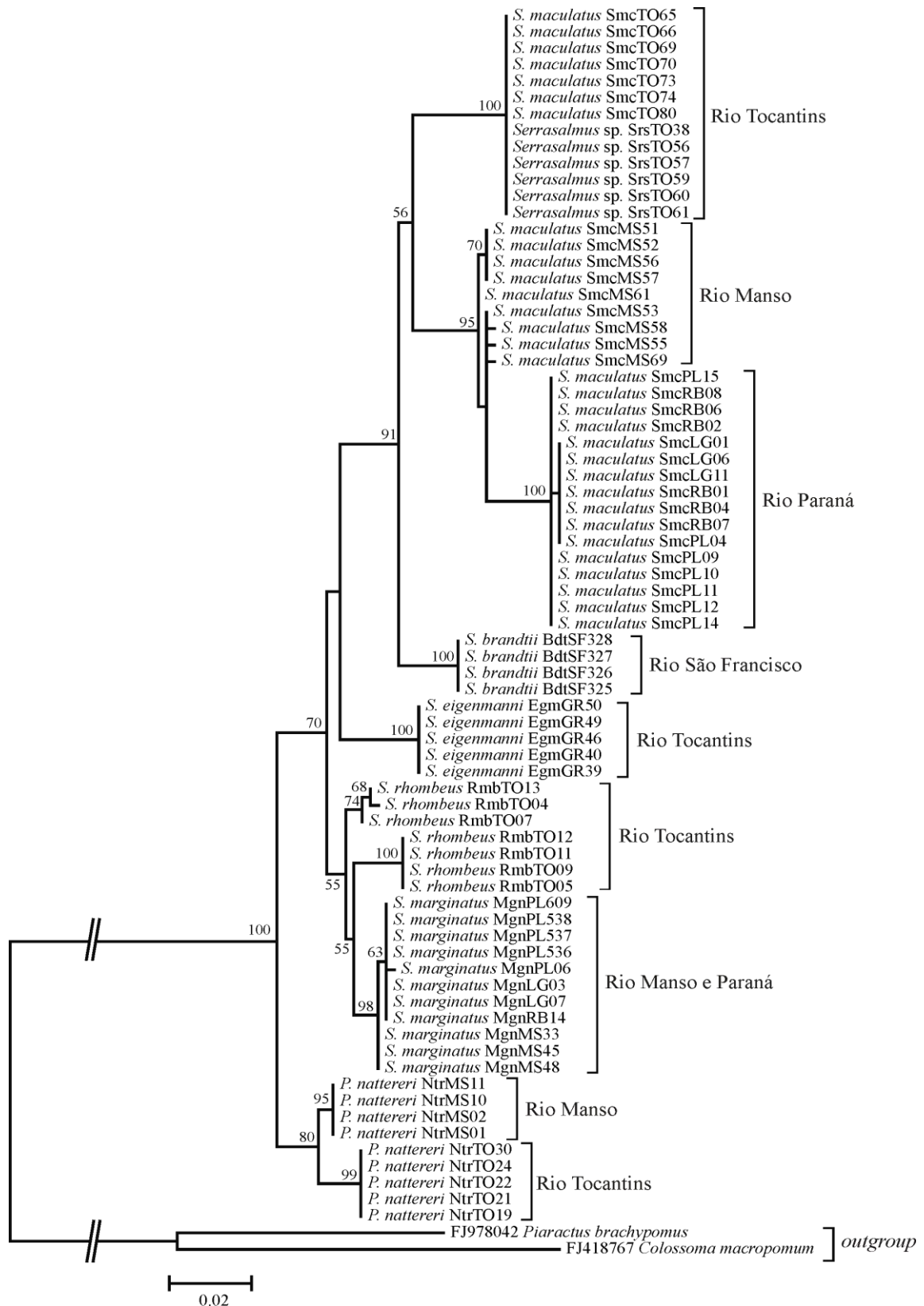


Figura 9 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança gerada a partir da sequência parcial do gene citocromo c oxidase I de diferentes espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, obtida com o modelo HKY + G. Números nas ramificações da árvore representam valores de *bootstrap* baseados em 1.000 reamostragens.

Ambos os dendrogramas apresentaram a mesma topologia e o mesmo padrão de clados. A única diferença entre as árvores *neighbor-joining* e de máxima-verossimilhança foi com relação ao posicionamento dos espécimes de *Serrasalmus eigenmanni*. Enquanto na análise inferida a partir do algoritmo *neighbor-joining* essa espécie ficou alocada como irmã do clado constituído por *S. rhombeus* e *S. marginatus*, no dendrograma de máxima verossimilhança essa espécie ficou mais próxima do clado formado por *S. maculatus*, *Serrasalmus* sp. e *S. brandtii*. Os altos valores de *bootstrap* foram consistentes à maioria dos agrupamentos. A condição monofilética de *Pygocentrus nattereri* foi corroborada na análise do gene *coxI*, assim como para o gênero *Serrasalmus*.

Com base nos requisitos sugeridos para análises de dados do DNA *barcode* (gene *coxI*, Hebert et al., 2003), foi construído um dendrograma *neighbor-joining* a partir do modelo evolutivo kimura-2-parâmetros (K2P) (Figura 10). A topologia da árvore foi exatamente a mesma daquela definida pelo dendrograma NJ construído com o modelo HKY + G (Figura 8).

Os valores médios de distância genética inferidos com base nos modelos de distância p e K2P foram bastante próximos, sendo que o último, em geral, apresentou valores ligeiramente maiores (Quadros 10 e 11). Dentro de cada um dos clados menores (NtrTO, NtrTMS, EgmGR, SrsTO, SmcTO, SmcMS, SmcPR, BdtSF, MgnMS MgnPR, RmbTO1 – amostras 04, 07, 13, e RmbTO2 – amostras 05, 09, 11 e 12) esses valores foram bastante baixos (variando de zero a 0,3%), enquanto que quando se compararam as distâncias genéticas entre os clados, pode-se notar valores maiores, variando de zero a 6,1% (Quadro 10). O Quadro 11 expõe os valores de distância p e K2P entre e dentro de espécies de piranhas, desconsiderando os locais de coleta, com exceção apenas de *S. maculatus* do rio Tocantins, que apresentou similaridade genética com *Serrasalmus* sp. A maior variabilidade dentro de uma espécie foi identificada em *S. rhombeus* (1,0%), seguido de *S. maculatus* (bacia hidrográfica Paraná-Paraguai, 0,9%) e *P. nattereri* (0,7%). As outras espécies apresentaram valores intraespecíficos de distância p e K2P nulo ou muito reduzido (0,1%).

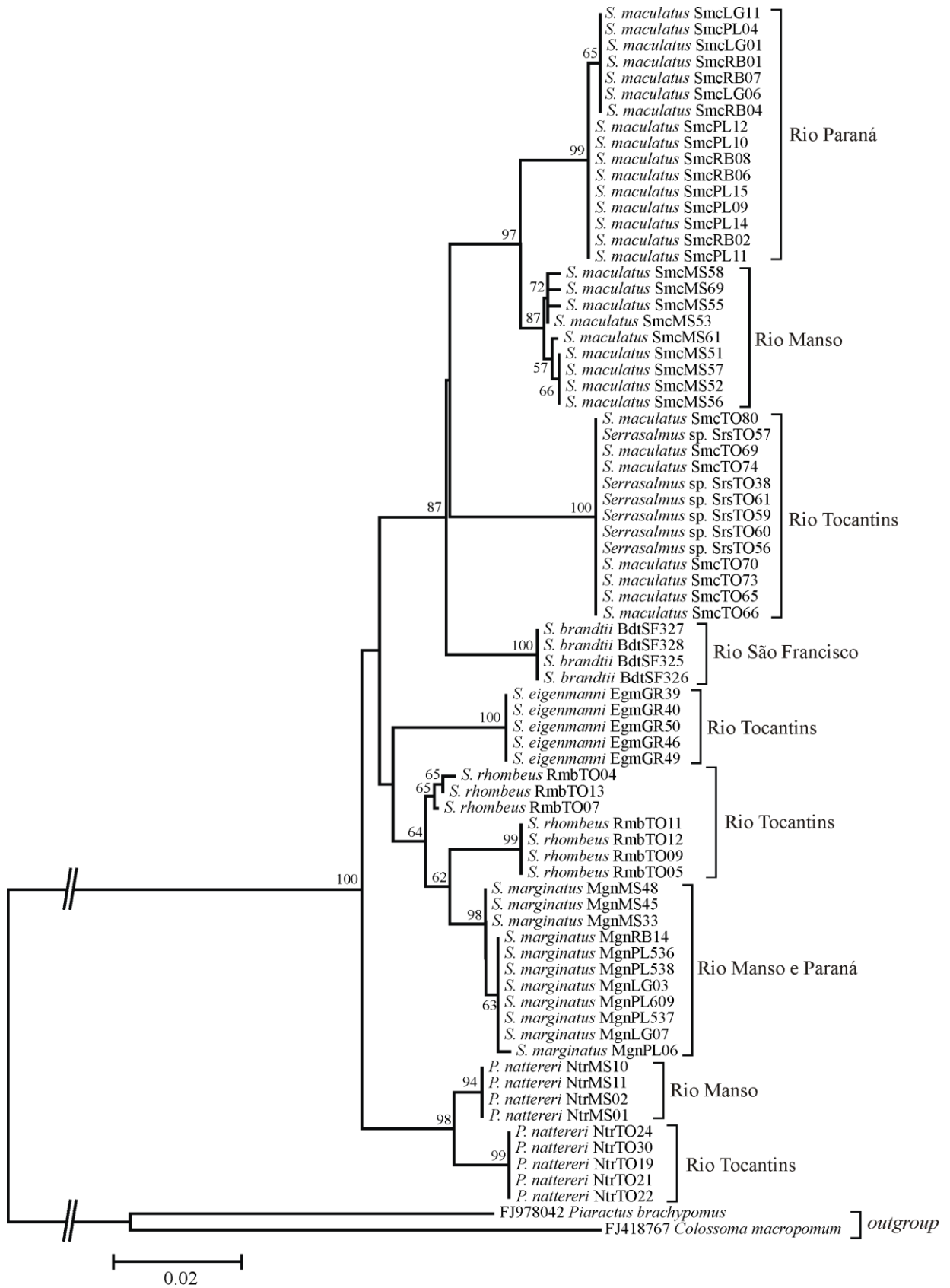


Figura 10 - Árvore filogenética *neighbor-joining* gerada a partir da sequência parcial do gene citocromo c oxidase I de espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, obtida com o modelo K2P. Números nas ramificações da árvore representam valores de *bootstrap* baseados em 10.000 reamostragens.

Quadro 10 - Valores médios de distâncias genéticas entre populações de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, obtidos com os modelos de distância p (abaixo da diagonal) e K2P (acima da diagonal), em porcentagem, a partir de seqüências do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I. Na diagonal, em cinza, distância p e K2P dentro de cada população. **1** = *P. nattereri*, rio Tocantins; **2** = *P. nattereri*, rio Manso; **3** = *S. maculatus*, rio Tocantins; **4** = *S. maculatus*, rio Manso; **5** = *S. maculatus*, alto rio Paraná; **6** = *S. marginatus*, rio Manso; **7** = *S. marginatus*, alto rio Paraná; **8** = *S. rhombeus*, rio Tocantins, grupo 1 (RmbTO04, 07, 13); **9** = *S. rhombeus*, rio Tocantins, grupo 2 (RmbTO05, 09, 11, 12); **10** = *S. eigenmanni*, rio Tocantins; **11** = *S. brandtii*, rio São Francisco; **12** = *Serrasalmus* sp., rio Tocantins

Espécie/ População	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0,0	1,3	6,1	5,6	5,6	3,8	4,0	4,0	4,7	4,1	5,3	6,1
2	1,3	0,0	5,9	5,0	5,0	3,6	3,8	3,4	4,2	4,0	4,7	5,9
3	5,8	5,6	0,0	3,7	4,6	4,9	5,2	4,5	5,6	4,7	3,8	0,0
4	5,3	4,8	3,6	0,3	1,7	4,5	4,7	3,7	5,1	5,1	3,3	3,7
5	5,4	4,8	4,4	1,7	0,1	5,0	5,3	4,2	5,6	5,6	3,7	4,6
6	3,6	3,5	4,7	4,3	4,8	0,0	0,2	1,3	1,7	2,4	4,2	4,9
7	3,8	3,6	4,9	4,5	5,0	0,2	0,0	1,5	1,9	2,6	4,4	5,2
8	3,8	3,3	4,3	3,6	4,1	1,3	1,5	0,2	1,7	3,0	3,6	4,5
9	4,5	4,0	5,3	4,8	5,4	1,6	1,8	1,7	0,0	3,8	4,4	5,6
10	4,0	3,8	4,5	4,9	5,4	2,4	2,6	2,9	3,6	0,0	4,3	4,7
11	5,1	4,5	3,6	3,2	3,5	4,0	4,2	3,5	4,2	4,2	0,0	3,8
12	5,8	5,6	0,0	3,6	4,4	4,7	4,9	4,3	5,3	4,5	3,6	0,0

As informações geradas a partir das seqüências do gene mitocondrial *coxI* foram concordantes com os resultados obtidos para o segmento *cytb*, com relação à separação das espécies e/ou populações. Pode-se observar ainda que *Pygocentrus nattereri* e *Serrasalmus maculatus*, espécies distribuídas ao longo das bacias hidrográficas Tocantins e Paraná-Paraguai, foram indubitavelmente separadas de acordo com suas localidades. Apesar de haver distinção entre as populações do rio Paraná e do rio Paraguai de ambas as espécies de ocorrência da bacia (*Serrasalmus maculatus* e *Serrasalmus marginatus*), essa separação ocorreu em patamares menos acentuados.

A separação em dois clados menores dos espécimes de *Pygocentrus nattereri* está relacionada aos locais de coleta. Essa divisão das populações das bacias dos rios Tocantins e Manso foi confirmada pelo alto valor de *bootstrap*. Apesar de não haver variabilidade dentro das populações, as mesmas diferenciaram-se entre si por valores de distância p e K2P de 1,3%. A discriminação dessas duas populações foi maior quando se utilizou sequências do gene *cytb*, provavelmente por este ser mais variável do que o gene *coxI*. Valores dessa magnitude foram detectados também entre as populações de *Serrasalmus maculatus* da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai (1,7%), indicando que essa diferença está em níveis populacionais.

Quadro 11 - Valores médios de distâncias genéticas entre espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, obtidos com os modelos de distância p (abaixo da diagonal) e K2P (acima da diagonal), em porcentagem, a partir de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I. Na diagonal, em cinza, distância p e K2P dentro de cada espécie. TO = rio Tocantins, MS = rio Manso, PR = alto rio Paraná, SF = rio São Francisco

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>P. nattereri</i> - TO e MS	0,7	6,1	5,3	3,8	4,1	4,1	5,1	6,1
2. <i>S. maculatus</i> - TO	5,7	0,0	4,3	5,1	5,1	4,7	3,8	0,0
3. <i>S. maculatus</i> - MS e PR	5,1	4,1	0,9	5,0	4,8	5,4	3,5	4,3
4. <i>S. marginatus</i> - MS e PR	3,7	4,9	4,8	0,1	1,7	2,6	4,3	5,1
5. <i>S. rhombeus</i> - TO	4,0	4,9	4,6	1,6	1,0	3,4	4,0	5,1
6. <i>S. eigenmanni</i> - TO	3,9	4,5	5,2	2,5	3,3	0,0	4,3	4,7
7. <i>S. brandtii</i> - SF	4,8	3,6	3,4	4,1	3,9	4,2	0,0	3,8
8. <i>Serrasalmus</i> sp. - TO	5,7	0,0	4,1	4,9	4,9	4,5	3,6	0,0

Exemplares da espécie atualmente identificada como *Serrasalmus maculatus* também foram separados entre si de acordo com suas respectivas localidades, de maneira que os altos valores de *bootstrap* apóiam as ramificações entre as três bacias hidrográficas. Os valores de distância p (e K2P) corroboraram essas divisões. As maiores divergências foram identificadas entre *S. maculatus* das bacias do rio Paraná e do rio Tocantins e entre o rio Manso e rio Tocantins, com distância p igual a 4,4%

(K2P = 4,6%) e 3,6% (K2P = 3,7%), respectivamente. Apesar de ser atribuído menor valor médio de distância genética entre *Serrasalmus maculatus* do alto rio Paraná e do rio Manso, ambas as populações foram separadas por valor de distância genética igual a 1,7%.

É indubitável o fato de que todos os espécimes de *Serrasalmus* sp. pertençam ao mesmo clado da população de *S. maculatus* do rio Tocantins. Além disso, essas duas espécies, de ocorrência na bacia do rio Tocantins, compartilham o mesmo haplótipo mitocondrial. Consequentemente apresentam valor nulo de distância genética (Quadro 11).

Os espécimes de *Serrassalmus rhombeus* mantiveram-se, mais uma vez, proximamente relacionados à *Serrasalmus marginatus* (distância p e K2P= 1,6% e 1,7%, respectivamente, Quadro 11) e foram também subdivididos em dois clados distintos. O grupo 2 de *S. rhombeus*, constituído pelas amostras RmbTO05, 09, 11 e 12, diferenciou-se do grupo 1, formado pelos indivíduos RmbTO04, 07 e 13, por um valor de distância p e K2P de 1,7%, sendo que o primeiro grupo está ligeiramente mais próximo de *S. marginatus* que o segundo (1,3 e 1,5% versus 1,6 ou 1,7% e 1,8 ou 1,9%, respectivamente). Apesar de haver diferenciação entre as populações de *S. marginatus* dos rios Manso e Paraná, os valores de distância genética foram bastante pequenos, com apenas 0,2% (Quadro 10).

A diferenciação genética entre os gêneros de piranha *Pygocentrus* e *Serrasalmus*, com base nas sequências nucleotídicas do gene mitocondrial *coxI*, foi de 4,8% baseada na distância p (ou 5,0% para distância K2P). Os valores médios de distância p e K2P identificados dentro do gênero *Pygocentrus* e dentro de *Serrasalmus* foram de 0,7% e 3,4% (K2P = 3,6%), respectivamente. O maior valor de distância genética detectado no gênero *Serrasalmus*, quando comparado ao gênero *Pygocentrus*, se deve, provavelmente, ao maior número de espécies analisadas dentro do gênero *Serrasalmus*.

O padrão de diferenciação genética baseada na matriz de distância HKY + G está ilustrado no gráfico de dispersão, gerado a partir de sequências parciais do gene mitocondrial *coxI* (Figura 11). Foi possível identificar os mesmos tipos de

agrupamentos e proximidades genéticas daqueles observados nos dendrogramas *neighbor-joining* e de máxima verossimilhança.

A árvore bayesiana construída a partir das sequências parciais do gene mitocondrial *coxI*, como pode ser visualizada na Figura 12, foi concordante com a separação das espécies e de suas respectivas populações, como havia sido previamente identificado tanto nos dendrogramas *neighbor-joining* e de máxima verossimilhança como no gráfico de dispersão em coordenadas principais. Altos valores de probabilidades posteriores obtidos na análise bayesiana sustentaram os clados formados.

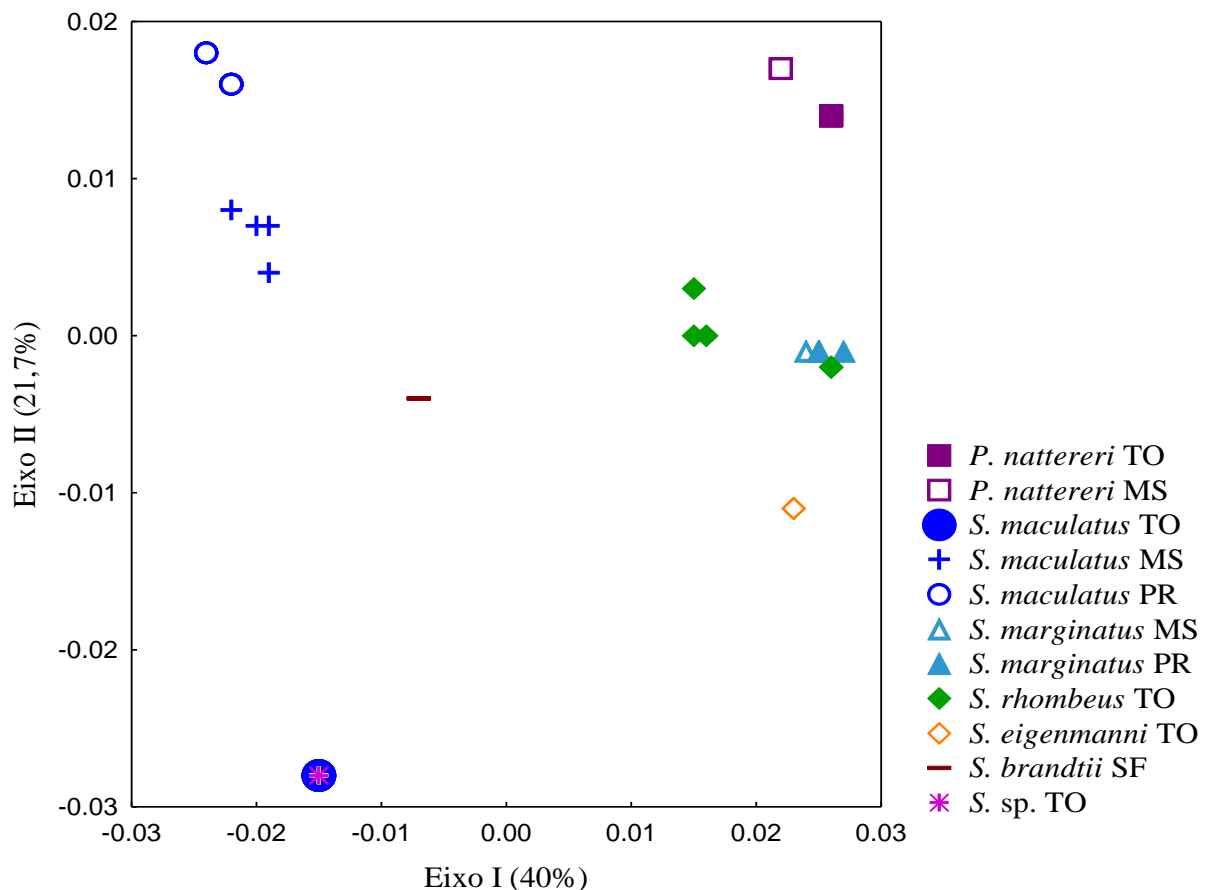


Figura 11 - Gráfico de dispersão em coordenadas principais 2D de espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, baseado na distância HKY + G do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (*CoxI*). TO = rio Tocantins, MS = rio Manso, PR = alto rio Paraná, SF = rio São Francisco.

3.3. Considerações sobre as hipóteses filogenéticas

As análises realizadas no presente trabalho não foram totalmente concordantes entre si, seja com relação ao tipo de sequência nucleotídica ou quanto ao algoritmo utilizado, demonstrando que as metodologias de análises filogenéticas são bastante sensíveis e podem variar de acordo com o critério empregado. De modo geral, os dendrogramas baseados nas sequências nucleotídicas dos dois genes mitocondriais apresentaram topologias semelhantes. Porém, apesar da separação de todas as espécies em ambos dendrogramas (com exceção de *Serrasalmus* sp.), as relações internas entre as mesmas não foram corroboradas. Os grupos mais problemáticos foram aqueles compostos por *Serrasalmus eigenmanni*, *S. brandtii* e *Pygocentrus piraya*, uma vez que ocuparam posições distintas dentro de cada árvore filogenética.

Machado-Allison (1985) propôs que os gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* fazem parte de um grupo monofilético que inclui também *Pygopristis* e *Prystobrycon*. Em estudo recente sobre cariótipo e regiões organizadoras do nucléolo (RONs) de *Pygocentrus cariba*, Gaviria et al. (2005) forneceram evidências adicionais para a hipótese sobre a proximidade genética entre *Serrasalmus* e *Pygocentrus*. Segundo os autores, as similaridades citogenéticas (número e tipo de cromossomos, multiplicidade de sítios RONs e distribuição de heterocromatina constitutiva localizada nas regiões centroméricas e teloméricas) existentes entre *P. cariba* e espécies do gênero *Serrasalmus*, demonstram o elevado grau de proximidade entre os dois gêneros.

Hubert et al. (2007) detectaram valor médio de distância genética igual a 10,2% entre espécies de *Serrasalmus* e *Pygocentrus*, com base na região controle hipervariável do DNA mitocondrial (*D-loop*). No presente trabalho, foram obtidos valores relativamente inferiores (5,5% e 4,8% para os genes citocromo b e citocromo c oxidase I, respectivamente). Contudo, como *cytb* e *coxI* são regiões codificadoras, seria esperado valores menores quando comparado à região controle (*D-loop*), que apresenta taxas de substituições nucleotídicas mais elevadas. Além disso, as sequências do gene mitocondrial *coxI* apresentaram-se mais conservadas do que as do gene *cytb*, resultando nos menores valores de distância p observados para *coxI*. Esse fato foi também documentado por Tobe et al. (2009).

Todos os dendrogramas foram congruentes quanto à condição monofilética da maioria das espécies. As exceções foram com relação à *S. maculatus*, *S. rhombeus* e *P. nattereri*. Pode-se observar que, nos dendrogramas construídos a partir das sequências do gene *cytb* (NJ e ML), as populações de *S. maculatus* formaram um clado que foi subdividido com espécimes de *S. brandtii* e que *P. piraya* foi agrupada dentro do clado formado por *P. nattereri* (NJ apenas). Todos os dendrogramas apresentados evidenciaram a separação de *S. rhombeus* em dois cladogramas menores, juntamente com *S. marginatus*, como descrito anteriormente.

A origem monofilética do gênero *Serrasalmus* não foi totalmente afirmada com base nos nossos resultados. Apesar da grande maioria das análises corroborarem a condição monofilética do gênero, como proposto anteriormente por Machado-Allison (1985) e Hubert et al. (2007), o dendrograma de máxima verossimilhança construído a partir do gene *cytb* alocou os espécimes de *Pygocentrus* dentro do clado formado por *Serrasalmus*. Outros trabalhos moleculares (Freeman et al., 2007; Ortí et al., 1996, 2008) também afirmaram a condição não-monofilética de *Serrasalmus*. Diversas sinapomorfias morfológicas, no entanto, dão suporte à monofilia de *Serrasalmus* (Jégu, 2004 in Hubert et al., 2007).

3.3.1. Delimitação de espécies de piranhas

Com exceção de *Serrasalmus* sp., todas as espécies foram discriminadas com base nas sequências nucleotídicas dos genes mitocondriais *cytb* e *coxI*. Valores de distância genética entre as espécies variaram entre 2,7 e 6,6% para *cytb* e entre 2,5 e 5,7% para *coxI* (Quadros 7 e 11). Valores bem menores, no entanto, foram detectados entre *S. rhombeus* e *S. marginatus* (ver item 3.3.1.5).

Na literatura, normalmente, são encontrados valores superiores de distância genética para o gene do citocromo b entre espécies próximas de peixes. Todavia, Perdices et al. (2004) e Lima et al. (2005) detectaram a existência de espécies crípticas de peixes ao encontrarem valores médios de distância genética superiores a 4 ou 16% entre populações de localidades distintas, respectivamente. Lovejoy e Araújo (2000) identificaram valores de divergência entre espécies de *Potamorrhaphis* equivalentes a 4,2% (*P. eigenmanni* vs. *P. guianensis*) e 12,3% (*P. petersi* vs. *P. guianensis*).

Da mesma maneira, valores de distância genética relativamente maiores foram observados para o gene citocromo c oxidase I. Valdez-Moreno et al. (2009) e Hubert et al. (2008) encontraram valores médios de 5,1 e 8,3% entre táxons congêneres de peixes de água doce. Toffoli et al. (2008) detectaram divergência entre espécies de raias pertencentes ao gênero *Potamotrygon* variando de 2,3 a 9,8%.

3.3.1.1. DNA *barcode*

Diferenças em sequências nucleotídicas mitocondriais têm sido empregadas na distinção de espécies há mais de 20 anos (Avice, 2004). Mais recentemente, Hebert et al. (2003) propuseram que uma região do gene citocromo c oxidase subunidade I poderia ser utilizada como ferramenta na identificação de espécies (DNA *barcode*). Uma vez que os padrões de variação intra e interespecífica em *coxI* são bastante similares em diversos grupos de animais, foi proposto um limiar: 10 vezes a variação média intraespecífica para o grupo em estudo (Hebert et al., 2004). Assim, se a média de variação intraespecífica de determinado grupo de organismos é de 1%, então todos os indivíduos, tomados dois a dois, com valores de divergência superior a 10% seriam considerados como pertencentes a espécies diferentes. A partir desse limiar de 10X seria possível fazer o reconhecimento de mais de 90% das espécies (Hebert et al., 2004). Apesar de ser um procedimento bastante controverso (Moritz e Cicero, 2004; Ebach e Carvalho, 2010), o DNA *barcode* tem se mostrado eficaz na distinção de muitas espécies (e.g., Hebert et al., 2004; Ward et al., 2005; Hubert et al., 2008).

O DNA *barcode*, com base nos pressupostos da metodologia (distância K2P e limiar de 10 vezes), foi eficiente na separação de algumas espécies de piranhas do presente estudo. A média de distância genética K2P intraespecífica encontrada para os espécimes de *Serrasalmus* e *Pygocentrus* foi de 0,38% (variação entre zero e 1%). Dessa maneira, o limiar para detecção de espécies de piranhas deveria ser superior a 3,8%. Apesar de a metodologia ter se mostrado eficiente na separação da maioria das espécies, valores inferiores a 3,8% foram encontrados entre espécies que são reconhecidamente distintas (Quadro 11). Dessa maneira, quando se trabalha com espécies que apresentam baixos valores interespecíficos, esta metodologia se mostra incapaz de detectar diferenças entre táxons distintos.

O procedimento “DNA *barcode*” se mostrou ineficaz também na discriminação de espécies de raias (Toffoli et al., 2008) e *Steindachnerina* (Gomes et al., 2009), para citar alguns exemplos. Metodologias como o DNA *barcode*, que se baseiam unicamente em um tipo de dado e critério, estão sujeitas a maiores níveis de fracasso do que aquelas que incorporam diversas fontes de informação (Toffoli et al., 2008), como caracteres morfológicos associados à ecologia, hábitos alimentares e sequências nucleotídicas mitocondriais e/ou nucleares.

3.3.1.2. *Pygocentrus nattereri* e *Pygocentrus piraya*

Pygocentrus é, provavelmente, o gênero mais conhecido entre as piranhas e compreende três espécies: *P. piraya*, *P. nattereri* e *P. cariba*. *Pygocentrus piraya* é endêmica do rio São Francisco e é diagnosticada pela presença de nadadeira adiposa com raios, enquanto *P. nattereri*, espécie altamente variável quanto à pigmentação, encontra-se amplamente distribuída pelos rios da América do Sul (Fink, 1993).

A diferenciação genética entre *P. nattereri* e *P. piraya* com base no marcador *cytb* foi evidente. Apesar das análises terem detectado baixos valores de distância *p* entre as duas espécies (2,7%), esse resultado seria esperado, uma vez que o evento de especiação que levou à diferenciação das duas espécies ocorreu durante apenas os últimos três milhões de anos (Hubert et al. (2007). As análises da sequência *cytb* forneceram ainda marcadores moleculares específicos para cada espécie, permitindo sua caracterização.

Foi identificada elevada variabilidade genética dentro de *P. nattereri*, como previamente observado por Fink (1993) com base na morfologia da espécie. Os dendrogramas gerados a partir das sequências nucleotídicas dos dois genes mitocondriais separaram os indivíduos de *P. nattereri* de acordo com suas localidades. A diferenciação entre os haplogrupos do rio Manso e do rio Tocantins é clara, em menor ou maior grau, com valores de distância genética variando entre 1,3% (*coxI*) e 3,1% (*cytb*). Os valores de divergência detectados entre as duas populações de *P. nattereri* são menores aos observados entre espécies do gênero *Serrasalmus* e também com relação aos encontrados na literatura, sugerindo que o polimorfismo existente em *P. nattereri* corresponde a variações intraespecíficas comumente encontradas em

populações isoladas geograficamente. Assim, *P. nattereri* consiste em mais de uma linhagem evolutiva.

A distinção entre populações de *P. nattereri* de distintas bacias hidrográficas já foi discutida anteriormente por Fink (1993) e Fink e Zelditch (1997) com base em características morfológicas. Fink (1993) relata não ter encontrado diferenças significativas que excedessem variações individuais ou populacionais dentro das bacias Amazônica e do rio Paraguai, uma vez que as populações do sul (rio Paraguai) apresentam valores de similaridades com relação à morfologia do corpo que estão dentro da extensão verificada na população do norte (bacia amazônica). No entanto, os espécimes do sul não abrangem toda a extensão dos exemplares do norte. O autor conclui que, apesar de existirem diferenças morfométricas e merísticas entre as populações, essas diferenças são bastante pequenas e não estão geograficamente correlacionadas.

Posteriormente, Fink e Zelditch (1997) realizaram análises de variação do formato do corpo e identificaram diferenças estatisticamente significativas entre as populações de *P. nattereri*: os indivíduos do rio Paraguai apresentam corpo com maior profundidade em relação ao comprimento corpóreo do que os exemplares da bacia Amazônica. Essa diferença na forma do corpo é consistente com a variação geográfica de uma única espécie que se encontra amplamente distribuída, o que corrobora nossos resultados.

A condição monofilética de *Pygocentrus nattereri* foi confirmada no presente estudo, corroborando os resultados de Fink (1993) e Ortí et al. (1996). Apenas o dendrograma de máxima verossimilhança baseado nas sequências do gene *cytb* não confirmou o monofiletismo.

3.3.1.3. *Serrasalmus maculatus* e *Serrasalmus* sp.

O mesmo padrão de diferenciação observado em *Pygocentrus nattereri* foi detectado também para os espécimes de *Serrasalmus maculatus* das bacias dos rios Tocantins e alto Paraguai. Porém, os valores de distância genética *p* foram relativamente maiores, variando de 3,7% a 3,6% para as sequências dos genes *cytb* e *coxI*, respectivamente. A população do alto rio Paraná também se apresentou bastante

diferenciada da população do rio Tocantins, como era esperado (distância $p = 3,9\%$ a $4,4\%$).

Apesar de valores bem maiores serem encontrados normalmente na literatura científica, para ambos os genes em outras espécies (Perdices et al., 2002; Hebert et al., 2003; Lima et al., 2005; Ward et al., 2005; Hubert et al., 2008; Benine et al., 2009), Lovejoy e Araújo (2000), Perdices et al. (2004), Toffoli et al. (2008) e Valdez-Moreno et al. (2009) identificaram valores de distância genética interespecífica bem próximos aos observados no presente trabalho. Além disso, valores interespecíficos encontrados para outras espécies do gênero *Serrasalmus* estão dentro da variação de distância genética observada entre as populações de *S. maculatus* das bacias hidrográficas Amazônica e Paraná-Paraguai. A presença do aminoácido isoleucina (sítio 148) no gene *cytb* apenas na população da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai confirma essa separação.

Os espécimes da piranha atualmente identificada como *Serrasalmus maculatus* das bacias hidrográficas Paraná-Paraguai e do rio Tocantins são distintas geneticamente, devendo ser tratadas, portanto, como espécies diferentes (Bignotto, neste trabalho). De acordo com o critério adotado na metodologia de DNA *barcode*, o valor de distância genética K2P encontrado entre as duas populações ($4,3\%$; Quadro 11) foi maior do que o limite padronizado pela metodologia ($3,8\%$). Portanto, *S. maculatus* da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai constitui realmente uma espécie distinta daquela presente no rio Tocantins. A condição não monofilética de *S. maculatus*, evidenciada nos dendrogramas NJ e ML baseados nas sequências do gene *cytb*, reafirma a hipótese de que *S. maculatus* constitui um complexo de espécies.

A identidade genética entre *Serrasalmus* sp. e *S. maculatus* da bacia do rio Tocantins, baseada em sequências de genes mitocondriais, foi verificada e discutida anteriormente (capítulo 1 deste trabalho). Ambas as espécies, de ocorrência na bacia do rio Tocantins (Lucinda et al., 2007), não foram discriminadas no presente estudo, uma vez que demonstraram ter haplótipos mitocondriais amplamente compartilhados. O compartilhamento de haplótipos pode indicar que a validade taxonômica dessas espécies deve ser revisada; que as linhagens não tiveram tempo suficiente para atingir,

cada uma, monofilia; que podem estar havendo eventos de hibridação, sendo *S. maculatus* o parental materno; ou a combinação desses fatores.

3.3.1.4. *Serrasalmus rhombeus* e *Serrasalmus marginatus*

Os baixos valores de distância genética identificados entre *Serrasalmus rhombeus* e *S. marginatus* (distância p = 1,8 e 1,6% para os genes *cytb* e *coxI*, respectivamente) foram bem inferiores aos detectados entre diferentes espécies de piranhas analisadas neste trabalho (Quadros 7 e 11). Duas explicações justificariam essa situação. Primeiro, espécimes identificados como *S. rhombeus* e *S. marginatus* representariam, na verdade, uma única espécie, com grande variabilidade intraespecífica. Outra explicação, mais plausível, para a baixa distância genética detectada entre *S. rhombeus* e *S. marginatus*, seria a de que essas espécies sofreram processo de especiação bastante recente, impossibilitando o acúmulo de polimorfismos no mtDNA. Ambas as espécies já foram descritas anteriormente e são bem definidas, sendo distintas morfologicamente entre si, o que dá mais suporte para a segunda hipótese.

De acordo com o limiar de 3,8% de distância genética K2P estabelecido para discriminação de espécies (segundo metodologia “DNA barcode”; Hebert et al., 2004), não foi possível a diferenciação de *S. rhombeus* e *S. marginatus*, o que demonstra que a utilidade desse método é questionável e não se aplica a espécies próximas entre si e que apresentam baixos valores interespecíficos de distância genética.

Os espécimes de *S. rhombeus* formaram dois grupos claramente separados nos dendrogramas e gráficos de dispersão, sendo distinguidos entre si por valores de distância p de 1,9 e 1,7% para as regiões *cytb* e *coxI*, respectivamente. Esses valores estão no mesmo patamar de divergência interespecífica de *S. rhombeus* e *S. marginatus*. Se considerarmos que *S. rhombeus* e *S. marginatus* são espécies válidas, então os dois grupos de *S. rhombeus* podem ser considerados espécies distintas. Há, portanto, indícios de que, na região de amostragem da bacia do rio Tocantins, existem, pelo menos, duas linhagens mitocondriais de *S. rhombeus* que, atualmente, são simpátricas e que divergiram entre si num passado recente.

A alta variabilidade dentro de *S. rhombeus* foi previamente documentada em diferentes trabalhos citogenéticos (Nakayama et al., 2001; Nirchio et al., 2002; Teixeira et al., 2006). A presença de diferentes citótipos, ocorrendo tanto em alopatria quanto em simpatria em *S. rhombeus*, indica que cada citótipo possivelmente represente uma espécie de peixe diferente (Nakayama et al., 2001).

Nossos resultados corroboram dados descritos anteriormente: de acordo com Géry (1976), *S. rhombeus* compreende um complexo de espécies (grupo *rhombeus*) constituído por seis a nove espécies, incluindo *S. rhombeus*, *S. marginatus*, *S. brandtii*, *S. spilopleura*, *S. elongatus*, entre outros (Nakayama et al., 2001). Assim, qualquer decisão com relação às espécies que compreendem esse complexo do grupo *rhombeus* deve ser tomada com cautela.

3.3.1.5. *Serrasalmus brandtii*

As análises realizadas no presente estudo apontaram para a proximidade genética existente entre *S. brandtii* e *S. maculatus*. Valores de distância p entre as duas espécies foram moderados, variando de 3,7% a 3,9%, para o gene *cytb* e de 3,2% a 3,6% para o gene *coxI*, dependendo da população de *S. maculatus* em que foi feita a comparação. De acordo com Hubert et al. (2007), o evento que deu origem às duas espécies ocorreu há aproximadamente 8 Ma. A proximidade genética entre *S. maculatus* e *S. brandtii* pode ser melhor visualizada nos dendrogramas e no gráfico de dispersão e foi confirmada por Cestari e Galetti Jr. (1992a) e Hubert et al. (2007). Os primeiros autores relataram que o cariótipo de *S. brandtii* do rio São Francisco apresentou-se muito similar àquele identificado em *S. maculatus* do alto rio Paraná (Cestari e Galetti Jr., 1992b), corroborando, portanto, nossos resultados.

3.4. Relações entre as bacias hidrográficas

Como demonstrado anteriormente, as populações de *Pygocentrus nattereri* e de *Serrasalmus maculatus* apresentaram haplótipos que estão associados às bacias hidrográficas Amazônica ou Paraná-Paraguai, ou seja, a diversidade está estruturada geograficamente, não havendo compartilhamento de haplótipos entre as localidades. O

padrão biogeográfico e a diferenciação genética encontrados nas populações de ambas as espécies pode ser resultado de processos como vicariância e dispersão.

Segundo Hubert e Renno (2006), o sistema Paraná-Paraguai foi separado da bacia Amazônica há 10 milhões de anos atrás (Ma). Portanto, a diferenciação genética poderia ter sido iniciada a partir desse momento, por vicariância, caso as populações fossem definitivamente separadas na formação das duas bacias. Registros fósseis indicam que as piranhas evoluíram há 11 Ma (Lundberg, 1998) e, segundo análises moleculares realizadas recentemente por Hubert et al. (2007), os gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* originaram-se há 9 Ma. Essas datas correspondem ao Mioceno, época em que se deu a separação das bacias hidrográficas Amazônica e Paraná-Paraguai, sugerindo que o processo de vicariância possivelmente teve influência na divergência entre ambas as populações de *S. maculatus* e de *P. nattereri*.

Do mesmo modo, eventos de dispersão foram relacionados a promoverem especiação alopátrica pós-dispersão em período posterior à interrupção das conexões entre as bacias (Hubert et al., 2007). Durante os últimos 10 milhões de anos, houve eventos de captura de cabeceiras do sistema Paraná pelo Amazônico (Lundberg et al., 1998). Ainda hoje, em épocas de chuvas, seria possível uma comunicação entre essas bacias e consequente troca de faunas nessa região. Muitos trabalhos já relataram a possível conexão das bacias Amazônica e Paraná-Paraguai por meio de estudos biogeográficos e de relações filogenéticas de espécies animais (e.g., Costa, 2003; Garda e Cannatella, 2007; Aquino e Schaefer, 2010; Antunes et al., 2010). Mesmo sendo espécies de peixes não propriamente migradoras, as piranhas realizam deslocamentos reduzidos (Braga, 1975). Possivelmente, ambos os eventos (vicariância e dispersão) atuaram na divergência das populações de *S. maculatus* e de *P. nattereri* das duas bacias hidrográficas.

Independentemente do processo que deu origem às diferenças entre as duas populações de *S. maculatus* ou de *P. nattereri*, o fluxo gênico entre as populações deve ter sido interrompido em um momento posterior à separação das duas bacias. Isso porque a quantidade de diferenças acumuladas e identificadas neste trabalho está em nível relativamente baixo. Hubert et al. (2007) obtiveram evidências de que pelo menos *P. nattereri* colonizou o rio Paraná há aproximadamente 2 Ma. Esse período é

relativamente recente, o que justificaria a baixa divergência encontrada entre as populações de *P. nattereri*. Já para *S. maculatus*, a diferenciação entre as linhagens da bacia Amazônica e do sistema Paraná-Paraguai deve ter ocorrido há mais tempo, uma vez que essa espécie apresenta maiores valores de divergência genética.

A biogeografia associada à distribuição dos haplótipos de ambas as espécies indica que as populações se encontram isoladas geograficamente, reprodutivamente ou por distância há tempo suficiente para que fossem acumuladas diferenças na molécula de DNA. Entretanto, os valores de divergência genética detectados entre as populações de *P. nattereri* não nos permitem afirmar que se tratam de espécies distintas. Por outro lado, os exemplares de *S. maculatus* apresentaram maior divergência entre as bacias hidrográficas, indicando que as populações dessa espécie podem ser consideradas espécies diferentes.

Segundo Hurwood e Hughes (1998), as relações genéticas de táxons distribuídos em rios deveriam refletir as atuais conexões hidrológicas. Portanto, peixes de uma mesma bacia hidrográfica apresentam-se mais proximamente relacionados e, dentro de uma bacia, populações de localidades adjacentes deveriam ser mais similares (Lovejoy e Araújo, 2000). Esse padrão foi detectado tanto para *S. maculatus* quanto para *S. marginatus*, espécies encontradas na bacia hidrográfica Paraná-Paraguai. Dentro de uma localidade (alto rio Paraná ou rio Manso), *S. maculatus* e *S. marginatus* apresentaram baixa diversidade, variando de 0 a 0,3%, enquanto que, quando as populações das respectivas espécies foram comparadas, valores diminutos de distância genética, mas maiores que dentro de uma localidade, foram detectados (Quadros 6 e 10), caracterizando polimorfismos normalmente encontrados em uma mesma espécie.

Sequências do gene *coxI* foram mais eficientes na separação das populações do alto rio Paraná e do alto rio Paraguai tanto de *S. maculatus* quanto de *S. marginatus* do que o gene *cytb*, de maneira que maiores valores de distância genética foram encontrados para *coxI*, principalmente com relação à primeira espécie. Não houve compartilhamento de haplótipos entre espécimes de *S. maculatus* dessas localidades para ambas as sequências nucleotídicas. Entretanto, para *Serrasalmus marginatus*, o haplótipo Hapl-Mgn-IV do gene *cytb* foi encontrado tanto no alto rio Paraná quanto no rio Manso (Quadro 4, Figuras 3 e 4). Talvez *S. marginatus* apresente maior capacidade

de dispersão que *S. maculatus*, justificando o compartilhamento de haplótipos e menores valores de distância genética entre as populações do rio Manso e do alto rio Paraná.

Possivelmente, deve ocorrer, ou houve, até muito recentemente, fluxo gênico entre as populações de *S. maculatus* e, também, de *S. marginatus*, da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai, o que explicaria a baixa distância genética. Eventuais migrações de montante para jusante e/ou a incorporação da subpopulação da região de Itaipu à população do alto rio Paraná podem ter contribuído na atenuação da diferenciação genética entre as populações.

Os saltos de Sete Quedas representaram uma barreira geográfica eficiente contra a migração no sentido jusante para montante. Isto é evidenciado pelas diferenças de ictiofauna nas duas regiões. Por exemplo, *S. marginatus* e mais cerca de três dezenas de espécies só atingiram o alto rio Paraná após a submersão de Sete Quedas pelo reservatório de Itaipu (Júlio Jr. et al., 2009). Entretanto, no sentido montante para jusante talvez a migração de indivíduos ocorresse com certa frequência.

Houve também maior proximidade genética entre espécies do rio São Francisco (*S. brandtii* e *P. piraya*) e da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai (*S. maculatus* e *P. nattereri*) do que com relação às espécies presentes no rio Tocantins (*S. maculatus* e *P. nattereri*). Isso parece estar de acordo com o encontrado na literatura. Mesmo depois da separação da bacia do alto rio Paraná e do rio São Francisco, há 65-1,8 Ma, eventos de captura de cabeceira foram identificados (Montoya-Burgos, 2003; Hubert e Renno, 2006), possibilitando trocas faunísticas entre as duas bacias. Entretanto, o mesmo não foi documentado entre as bacias do rio São Francisco e do rio Tocantins.

Além dos eventos de captura de cabeceira entre a bacia do alto rio Paraná e a bacia do rio São Francisco, outras duas situações ocorreram na região, promovendo a dispersão de peixes entre as bacias. A primeira foi a transposição artificial, na década de 1960, do rio Piumhi, pertencente originalmente à bacia do alto rio Paraná, para o rio São Francisco (Moreira-Filho e Backup, 2005). A segunda, de acordo com Blanco et al. (2010), anteriormente à transposição, é a existência de uma área alagável (Cururu), provável região de conexão natural entre os rios Piumhi e São Francisco. Vários

estudos indicam a possibilidade de essas situações terem realmente afetado a ictiofauna do local (e.g. Bellafronte et al., 2010; Blanco et al., 2010; Lui et al., 2010). Dessa maneira, esses fatores devem ter contribuído para a maior proximidade genética entre espécies do rio São Francisco e da bacia hidrográfica Paraná-Paraguai.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que o padrão biogeográfico encontrado para as espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* parece estar de acordo com os eventos geológicos e hidrológicos anteriormente documentados em literatura. A separação das bacias hidrográficas, assim como eventos de captura de cabeceiras e rotas de dispersão entre diferentes sistemas fluviais ocorridos no passado parecem ter influenciado fortemente a distribuição das espécies de piranhas.

4. CONCLUSÕES

a) Dentro de algumas espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* existem diversas linhagens evolutivas independentes.

b) Espécimes de *Pygocentrus nattereri* das bacias dos rios Tocantins e alto Paraguai estão estruturados em populações geneticamente diferenciadas, com elevada variabilidade genética.

c) *Serrasalmus rhombeus* compreende, pelo menos, duas linhagens mitocondriais divergentes que atualmente coexistem em simpatria na bacia do rio Tocantins.

d) As populações de *Serrasalmus maculatus* das bacias hidrográficas Tocantins e Paraná-Paraguai apresentaram alta variabilidade genética, com indícios de que a espécie constitui um complexo de pelo menos duas espécies.

e) Critérios estabelecidos pela metodologia de DNA *barcode* não foram totalmente eficientes na discriminação de todas as espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*.

f) A constituição genética de espécies de piranhas com distribuição nas bacias hidrográficas Paraná-Paraguai, Tocantins e São Francisco está de acordo com os processos paleogeológicos e hidrológicos conhecidos.

5. CONCLUSÕES GERAIS

a) Marcadores moleculares mitocondriais *D-loop*, *cytb* e *coxI* demonstraram ser eficientes na separação de espécies próximas de piranhas.

b) A metodologia de DNA *barcode* (gene *coxI*) não foi eficiente na discriminação de todas as espécies de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus*.

c) O gênero *Serrasalmus* apresenta várias espécies com possibilidade de representarem um complexo de espécies crípticas.

d) Espécies presentes em mais de uma bacia hidrográfica apresentam populações estruturadas geograficamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, C.S.; JÚLIO Jr.; H.F. Observation of an invasion of the piranha *Serrasalmus marginatus* Valenciennes, 1847 (Osteichthyes, Serrasalminidae) into the upper Paraná River, Brazil. **Acta Sci.**, 24:391-395, 2002.
- ANTUNES, R.S.P.; GOMES, V.N.; PRIOLI, S.M.A.P; PRIOLI, R.A.; JÚLIO Jr., H.F.; PRIOLI, L.M.; AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, A.J. Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, 9:674-684, 2010.
- AQUINO, A.E.; SCHAEFER, S.A. Systematics of the genus *Hypoptopoma* Günther, 1868 (Siluriformes, Loricariidae). **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.**, 336:1-110, 2010
- ARDURA, A.; LINDE, A.R.; MOREIRA, J.C.; GARCIA-VAZQUEZ, E. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biol. Conserv.**, 143:1438–1443, 2010.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2004. 684p.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 18:489-522, 1987.
- BELLAFRONTE, E.; MOREIRA-FILHO, O. VICARI, M.R.; ARTONI, R.E.; BERTOLLO, L.A.C.; MARGARIDO, V.P. Cytogenetic identification of invasive fish species following connections between hydrographic basins. **Hydrobiologia**, 649:347-354, 2010.
- BENINE, R.C.; MARIGUELA, T.C.; OLIVEIRA, C. New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. **Neotrop. Ichthyol.**, 7:161-168, 2009.
- BLANCO, D.R.; LUI, R.L.; BERTOLLO, L.A.C.; DINIZ, D.; MOREIRA-FILHO, O. Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Rev. Fish Biol. Fisher.**, 20:1-8, 2010.

BRAGA, R.A. **Ecologia e etologia das piranhas do nordeste do Brasil (Pisces, *Serrasalmus Lacépède, 1803*)**. Fortaleza: DNOCS, 1975. 268p.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 36:135-153, 2005.

CANTATORE, P.; ROBERTI, M.; PESOLE, G.; LUDOVICO, A.; MILELLA, F.; GADALETA, M.N.; SACCONI, C. Evolutionary analysis of cytochrome *b* sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. **J. Mol. Evol.**, 39:589-597, 1994.

CESTARI, M.M.; GALETTI JR, P.M. Chromosome evolution in the genus *Serrasalmus* and cytotoxic considerations about Serrasalminae (Characidae, Pisces). **Rev. Bras. Genet.**, 15:555-567, 1992a.

CESTARI, M.M.; GALETTI JR, P.M. Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguay rivers: evolutionary and cytotoxic considerations. **Copeia**, 1:108-112, 1992b.

COSTA, W.J.E.M. *Moema heterostigma*, a new annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the Brazilian Pantanal, Rio Paraguay basin. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, 14:289-294, 2003.

EBACH, M.C.; CARVALHO, M.R. Anti-intellectualism in the DNA Barcoding Enterprise. **Zoologia**, 27: 165-178, 2010.

ESPOSTI, D.M.; DE VRIES, S.; CRIMI, M.; GHELLI, A.; PATARNELLO, T.; MEYER, A. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. **Biochim. Biophys. Acta**, 1143:243-271, 1993.

FARIAS, I.P.; ORTÍ, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; MEYER, A. The cytochrome *b* gene as phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. **J. Mol. Evol.**, 53:89-103, 2001.

FINK, W.L. Revision of the piranha genus *Pygocentrus* (Teleostei, Characiformes). **Copeia**, 665-687, 1993.

FINK, W.L.; MACHADO-ALLISON, A. Three new species of piranhas from Brazil and Venezuela (Teleostei: Characiformes). **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, 3:55-71, 1992.

FINK, W.L.; ZELDITCH, M. Shape analysis and taxonomic status of *Pygocentrus* piranhas (Ostariophysi, Characiformes) from the Paraguay and Paraná River basins of South America. **Copeia**, 1:179-182, 1997.

FREEMAN, B.; NICO, L.G.; OSENTOSKI, M.; JELKS, H.L.; COLLINS, T.M. Molecular systematic of Serrasalminidae: Deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. **Zootaxa**, 1484:1-38, 2007.

GARDA, A.A.; CANNATELLA, D.C. Phylogeny and biogeography of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudae) inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA. **Mol. Phyl. Evol.**, 44:104-114, 2007.

GAVIRIA, J.I.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; ESTRADA, A. Karyotype and nucleolar organizers regions of *Pygocentrus cariba* (Serrasalminae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Interciência**, 30:44-47, 2005.

GÉRY, J. Les genres de Serrasalminidae (Pisces-Characoidei). **Bull. Zool. Mus. Univ. van Amsterdam**, 5:47-54, 1976.

GOULDING, M. **The fishes and forest exploration in Amazonian natural history**. Berkeley: University of California, 1980. 280 p.

GODOY, M.P. **Peixes e pesca do rio Paraná: área do futuro reservatório de Ilha Grande**. Florianópolis: ELETROSUL, 1986. 146 p.

GOMES, V.N.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; PAVANELLI, C.S. Avaliação da potencialidade da região citocromo c oxidase I em discriminar *Steindachnerina inculpta* e *Steindachnerina brevipinna*. In: XIII SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES. "Biodiversidade, Variabilidade e Aplicações". Ponta Grossa, 2009. **Resumos...** Ponta Grossa: UEPG, 2009. p. 188-188.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. PhyML - A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Syst. Biol.**, 52:696-704, 2003

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, 41:95-98, 1999.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DE WAARD, J.R. Biological identifications through barcodes. **Proc. Roy. Soc. London Ser. B.**, 270:313-322, 2003.

HEBERT, P.D.N.; STOECKLE, M.Y.; ZEMLAK, T.S.; FRANCIS, C.M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biol.**, 2:1657-1663. 2004.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; GARCIA-DAVILA, C.; PAUGY, D.; RENNO, J-F. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Mol. Ecol.**, 16:2115-2136, 2007.

HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N.E.; TAYLOR, E.; BURRIDGE, M.; WATKINSON, D.; DUMONT, P.; CURRY, A.; BENTZEN, P. ZHANG, J.; APRIL, J.; BERNATCHEZ, L. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. **PLoS ONE**, 3:1-8, 2008.

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

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, 17:754-755, 2001.

HURWOOD, D.A.; HUGHES, J.M. Phylogeography of the freshwater fish, *Mogurnda adspersa*, in streams of northeastern Queensland, Australia: evidence for altered drainage patterns. **Mol. Ecol.**, 7:1507-1517, 1998.

IVANOVA, N.V.; ZEMLAK, T.S.; HANNER, R.H.; HEBERT, R.H. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Mol. Ecol. Notes**, 7:544-548, 2007.

JAVONILLO, R.; MALABARBA, L.R.; WEITZMAN, S.H.; BURNS, J.R. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Mol. Phylog. Evol.**, 54:498-511, 2010.

JÉGU, M. Subfamily Serrasalminae (Pacus and piranhas). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. (eds.). **Check-List of freshwater fishes from South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.182-196.

JÚLIO Jr.; H.F.; TÓS, C.D.; AGOSTINHO, A.A.; PAVANELLI, C.S. A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. **Neotrop. Ichthyol.**, 7:709-718, 2009.

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

KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proc Natl Acad Sci USA**, 86:6196-6200, 1989.

KUMAR, S.; GADAGKAR, S.R. Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. **J. Mol. Evol.**, 51:544-553, 2000.

LEGENDRE, P.; ANDERSON, M.J. 1998. **Program DistPCoA**. Montréal: Université de Montréal, 1998.

LIMA, D.; FREITAS, J.E.P.; ARAUJO, M.E.; SOLÉ-CAVA, A.M. Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. **J. Exp. Marine Biol. Ecol.**, 320:211– 223, 2005.

LOVEJOY, N.R.; ARAÚJO, M.L.G. Molecular systematics, biogeography, and population structure of neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Mol. Ecol.**, 9:259-268, 2000.

LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; MARGARIDO, V.P.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. **Biol. J. Linn. Soc.**, 99:648-656, 2010.

LUNDBERG, J.G. The temporal context for the diversification of neotropical fishes. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 49-68.

LUNDBERG, J.G.; MARSHALL, L.G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M.C.S.L.; WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American Rivers. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 13-48.

MACHADO-ALLISON, A. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia Serrasalminae. Parte III. Sobre el estatus generico y relaciones filogenéticas de los géneros *Pygopristis*, *Pygocentrus*, *Pristobrycon* y *Serrasalmus* (Teleostei–Characidae–Serrasalminae). **Acta Biol. Venez.**, 12:19-42, 1985.

MEYER, A. DNA technology and phylogeny of fish. In: BEAUMONT, A.R. (ed.). **Genetics and evolution of aquatic organisms**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 219-249.

MEYER, A.; KOCHER, T.D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A.C. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**, 347:550-553, 1990.

MONESI, N.; JACOBS-LORENA, M.; PAÇO-LARSON, M.L. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma** 107:559-569, 1998.

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

MOREIRA-FILHO, O.; BUCKUP, P.A. A poorly known case of water shed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. **Neotropical Ichthyol.**, 3:449-452, 2005

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. **PLoS Biol.**, 2:1529-1531, 2004.

NAKAYAMA, C.M.; JEGÚ, M.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. **Copeia**, 3:866-869, 2001.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. Hoboken: John Wiley, 2006. 601p.

NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; RON, E.; PÉREZ, J.E. Karyotype and nucleolar organizer regions in *Serrasalmus rhombeus* (Serrasalminae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Interciência**, 27:676-678, 2002.

ORTÍ, G.; SIVASUNDAR, A.; DIETZ, K.; JÉGU, M. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genet. Mol. Biol.**, 31:343-351, 2008. (Supl. 1)

ORTÍ, G.; PETRY, P.; PORTO, J.I.R.; JÉGU, M.; MEYER, A. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. **J. Mol. Evol.**, 42:169-182, 1996.

- PAIVA, M.P. **Grandes represas do Brasil**. Editerra Editorial. São Paulo, 1982. 292p.
- PERDICES, A.; CUNHA, C.; COELHO, M.M. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (= Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences. **Mol. Phyl. Evol.**, 31:192-203, 2004.
- PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Mol. Phyl. Evol.**, 25:172–189, 2002.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, 14:817-818, 1998.
- PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO Jr., H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Gen. Mol. Biol.**, 25:421-430, 2002.
- ROSENTHAL, A.; O. COUTELLE; M. CRAXTON. Large-scale of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. **Nucl. Acids Res.**, 21:173-174, 1993.
- SATO, Y.; GODINHO, H.P. Migratory fishes of the São Francisco River. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (eds.). **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. British Columbia: IDRC Publications. 2004. 380p.
- SAZIMA, I.; MACHADO, F.A. Underwater observations of piranhas in western Brazil. **Environm. Biol. Fishes**, 28:17-31, 1990.
- STATSOFT INC. **Statistica 6: data analysis software system**. Tulsa, 2001. WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>. Acesso em: 15, junho, 2010.
- SWOFFORD, D.L. **PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods version 4**. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, 24:1596-1599, 2007.

TAMURA K, NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. **Mol. Biol. Evol.**, 10:512–526, 1993.

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

THOMÉ, M.T.C.; ZAMUDIO, K.R.; GIOVANELLI, J.G.R.; HADDAD, C.F.B.; BALDISSERA Jr., F.A.; ALEXANDRINO, J. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Mol. Phyl. Evol.**, 55:1018–1031, 2010.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids Res.**, 22:4673-4680, 1994.

TOBE, S.S.; KITCHENER, A.; LINACRE, A. Cytochrome b or cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification - An answer to the debate. **Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Series**, 2:306-307, 2009.

TOFFOLI, D.; HRBEK, T.; ARAÚJO, M.L.G.; DE ALMEIDA, M.P.; CHARVET-ALMEIDA, P.; FARIAS, I.P. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). **Genet. Mol. Biol.**, 31:324-336, 2008. (Supl. 1).

VALDEZ-MORENO, M.; IVANOVA, N.V.; ELÍAS-GUTIÉRREZ, M.; CONTRERAS-BALDERAS, S.; HEBERT, P. D. N. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. **J. Fish Biol.**, 74:377-402, 2009.

VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e sócio-econômicos**. Maringá: EDUEM, 1997. 460p.

VILLARES Jr. G.A.; GOMIERO, L.M.; GOITEIN, R. Alimentação de *Serrasalmus maculatus* (Kner, 1858) (Characiformes; Serrasalmidae) no trecho inferior bacia do rio Sorocaba, São Paulo, Brasil. **Acta Sci. Biol. Sci.**, 30: 267-273, 2008.

WARD, R.D.; HOLMES, B.H. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (coxI) in fishes. **Mol. Ecol. Notes**, 7:899-907, 2007.

WARD, R.D.; ZEMLAK, S.Z.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. **Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.**, 360:1847-1857, 2005.

XIA, X.H.; XIE, Z.H. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **J. Heredity**, 92:371-373, 2001.

XIA, X.H.; XIE, Z.H.; SALEMI, M.; CHEN, L.; WANG., Y. An index of substitution saturation and its application. **Mol. Phyl. Evol.**, 26:1-7, 2003.

ANEXO 1

Fotos de espécimes de *Serrasalmus maculatus* das bacias hidrográficas Paraná-Paraguai e Tocantins utilizados nas análises do capítulo 1 desta tese.



Figura 1 - *Serrasalmus maculatus* da bacia do alto rio Paraná. Comprimento padrão: 97,3 mm. Testemunho: NUP 4208.



Figura 2 - *Serrasalmus maculatus* da bacia do alto rio Paraguai (Rio Manso). Comprimento padrão: 112,6 mm. Testemunho: NUP 884.



Figura 3 - *Serrasalmus maculatus* da bacia do rio Tocantins. Testemunho: UNT 8175.



Figura 4 - *Serrasalmus* sp. da bacia do rio Tocantins. Testemunho: UNT 8021.

ANEXO 2

Quadro 1 - Sequências do DNA mitocondrial de diferentes espécies de peixes da ordem Characiformes e seus respectivos números de acesso no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizadas nas análises de distância genética p para as regiões do *D-loop*, citocromo b (*cytb*) e citocromo c oxidase I (*coxI*)

Espécie	Número de acesso no <i>Genbank</i>	Região do DNA mitocondrial
<i>Prochilodus magdalenae</i>	AF282764	<i>D-loop</i>
<i>Prochilodus magdalenae</i>	AF282763	<i>D-loop</i>
<i>Prochilodus nigricans</i>	AF282762	<i>D-loop</i>
<i>Prochilodus lineatus</i>	AF282761	<i>D-loop</i>
<i>Prochilodus lineatus</i>	AF282760	<i>D-loop</i>
<i>Prochilodus mariae</i>	AF282735	<i>D-loop</i>
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	AF283959	<i>D-loop</i>
<i>Piaractus brachypomus</i>	AF283958	<i>D-loop</i>
<i>Mylossoma paraguayensis</i>	AF283962	<i>D-loop</i>
<i>Mylossoma duriventre</i>	AF283961	<i>D-loop</i>
<i>Myleus schomburgkii</i>	AF283968	<i>D-loop</i>
<i>Myleus tiete</i>	AF283966	<i>D-loop</i>
<i>Myleus asterias</i>	AF283964	<i>D-loop</i>
<i>Myleus ternetzi</i>	AF283967	<i>D-loop</i>
<i>Myleus rhomboidalis</i>	AF283976	<i>D-loop</i>
<i>Myleus setiger</i>	AF283970	<i>D-loop</i>
<i>Mylesinus paraschomburgkii</i>	AF283971	<i>D-loop</i>
<i>Mylesinus paucisquamatus</i>	AF283973	<i>D-loop</i>
<i>Brycinus schoutedeni</i>	AY791377	<i>Cytb</i>
<i>Brycinus caroliniae</i>	AY791357	<i>Cytb</i>
<i>Brycinus imberi</i>	AY791368	<i>Cytb</i>
<i>Brycinus lateralis</i>	AY791369	<i>Cytb</i>
<i>Brycinus macrolepidotus</i>	AY791356	<i>Cytb</i>
<i>Brycinus nurse</i>	AY791366	<i>Cytb</i>
<i>Brycinus opisthotaenia</i>	AY791372	<i>Cytb</i>
<i>Distichodus hypostomatus</i>	AY791391	<i>Cytb</i>
<i>Distichodus fasciolatus</i>	AY791393	<i>Cytb</i>
<i>Distichodus lusosso</i>	AY791394	<i>Cytb</i>
<i>Distichodus notospilus</i>	AY791395	<i>Cytb</i>
<i>Distichodus sexfasciatus</i>	AY791396	<i>Cytb</i>
<i>Alestes baremoze</i>	AY791360	<i>Cytb</i>
<i>Alestes macrophthalmus</i>	AY791361	<i>Cytb</i>
<i>Alestopetersius caudalis</i>	AY791401	<i>Cytb</i>
<i>Alestopetersius hilgendorfi</i>	AY791432	<i>Cytb</i>
<i>Characidium vidali</i>	AY791388	<i>Cytb</i>
<i>Characidium fasciatum</i>	AY791380	<i>Cytb</i>
<i>Hydrocynus brevis</i>	AY791400	<i>Cytb</i>
<i>Hydrocynus forskahlii</i>	AY791403	<i>Cytb</i>
<i>Hydrocynus vittatus</i>	AY791404	<i>Cytb</i>

Quadro 1, Cont...

Espécie	Número de acesso no Genbank	Região do DNA mitocondrial
<i>Micralestes acutidens</i>	AY791418	<i>Cytb</i>
<i>Micralestes occidentalis</i>	AY791358	<i>Cytb</i>
<i>Micralestes pabrensis</i>	AY791387	<i>Cytb</i>
<i>Neolebias ansorgii</i>	AY791423	<i>Cytb</i>
<i>Neolebias powelli</i>	AY791424	<i>Cytb</i>
<i>Neolebias trilineatus</i>	AY791425	<i>Cytb</i>
<i>Bramocharax caballeroi</i>	EU751680	<i>CoxI</i>
<i>Bramocharax baileyi</i>	EU751668	<i>CoxI</i>
<i>Brycon guatemalensis</i>	EU751726	<i>CoxI</i>
<i>Brycon melanopterus</i>	FJ978040	<i>CoxI</i>
<i>Bryconamericus iheringii</i>	FJ749041	<i>CoxI</i>
<i>Bryconamericus patriciae</i>	FJ749042	<i>CoxI</i>
<i>Bryconamericus stramineus</i>	FJ749043	<i>CoxI</i>
<i>Hyphessobrycon eques</i>	FJ749057	<i>CoxI</i>
<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>	FJ749040	<i>CoxI</i>
<i>Hyphessobrycon erythrostigma</i>	FJ749055	<i>CoxI</i>
<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>	FJ749053	<i>CoxI</i>
<i>Hyphessobrycon megalopterus</i>	FJ749058	<i>CoxI</i>
<i>Mimagoniates inequalis</i>	FJ749072	<i>CoxI</i>
<i>Mimagoniates microlepis</i>	FJ749073	<i>CoxI</i>
<i>Mimagoniates rheocharis</i>	FJ749074	<i>CoxI</i>
<i>Mimagoniates sp.</i>	FJ749075	<i>CoxI</i>

ANEXO 3

Fotos de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* das bacias hidrográficas do alto rio Paraná, alto rio Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco utilizadas nos estudos do capítulo 2 desta tese.



Figura 1 - *Pygocentrus nattereri* da bacia do rio Tocantins. Testemunho: UNT 8148.



Figura 2 - *Pygocentrus nattereri* da bacia do alto rio Paraguai (rio Manso). Comprimento padrão: 133,4 mm. Testemunho: NUP 886.



Figura 3 - *Pygocentrus piraya* da bacia do rio São Francisco.



Figura 4 - *Serrasalmus marginatus* da bacia do alto rio Paraguai (rio Manso). Comprimento padrão: 130,5 mm. Testemunho: NUP 885.



Figura 5 - *Serrasalmus marginatus* da bacia do alto rio Paraná. Comprimento padrão: 123,3 mm. Testemunho: NUP 6374.



Figura 6 - *Serrasalmus rhombeus* da bacia do rio Tocantins.



Figura 7 - *Serrasalmus eigenmanni* da bacia do rio Tocantins.



Figura 8 - *Serrasalmus brandtii* da bacia do rio São Francisco.



Figura 9 - *Serrasalmus* sp. da bacia do rio Tocantins. Testemunho: UNT 8021.



Figura 10 - *Serrasalmus maculatus* da bacia do rio Tocantins. Testemunho: UNT 8175.



Figura 11 - *Serrasalmus maculatus* da bacia do alto rio Paraguai (Rio Manso). Comprimento padrão: 112,6 mm. Testemunho: NUP 884.



Figura 12 - *Serrasalmus maculatus* da bacia do alto rio Paraná. Comprimento padrão: 97,3 mm. Testemunho: NUP 4208.