

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

THIAGO CINTRA MANIGLIA

Caracterização molecular de espécies de *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil:
variabilidade e diferenciação genética, hibridação e filogeografia

Maringá

2010

THIAGO CINTRA MANIGLIA

Caracterização molecular de espécies de *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil:
variabilidade e diferenciação genética, hibridação e filogeografia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais
Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli

Maringá

2010

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

M278c Maniglia, Thiago Cintra, 1980-
Caracterização molecular de espécies de *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil: variabilidade e diferenciação genética, hibridação e filogeografia / Thiago Cintra Maniglia. – Maringá, 2010.
61 f.: il. (algumas color.).
Tese (doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2010.
Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.
1. *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) "Raia fluvial" - Genética de populações - Brasil. 2. *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) "Raia fluvial" - Genética de populações - Planície de inundação - Alto rio Paraná. 3. Raias de água doce - Genética de populações. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em "Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais".

CDD 22. ed. -597.3517880981
NBR/CIP - 12899 AACR/2

FOLHA DE APROVAÇÃO

THIAGO CINTRA MANIGLIA

Caracterização molecular de espécies de *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil:
variabilidade e diferenciação genética, hibridação e filogeografia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alberto José Prioli
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira
Centro Universitário de Maringá (CESUMAR)

Prof. Dr. Rubens Pazza
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Prof. Dr. Horácio Ferreira Júlio Júnior
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá

Dr.^a Carla Simone Pavanelli
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá

Aprovado em: 26 de abril de 2010

Local de defesa: Anfiteatro do Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

A realização deste trabalho reuniu várias pessoas, as quais eu agradeço, pois vocês contribuíram direta ou indiretamente, para a concretização desse trabalho. E as pessoas que ainda virão e certamente trarão muita alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Ao prof. Dr. Alberto José Prioli pela orientação, ensinamentos científicos e amizade.

À prof. Dra. Sônia M. A. P. Prioli pela amizade e apoio em todos os momentos de realização desta etapa.

À Capes pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais pela oportunidade de realização desta tese.

Ao Nupélia pelo apoio logístico.

À minha esposa Iraúza Arroteia Fonseca, pela companhia, lealdade, amor, amizade, maternidade e apoio incondicional.

À minha família que apesar da distância sempre estiveram presente nos meus pensamentos.

A todos meus amigos, que durante mais de 10 anos em Maringá me apoiaram. Em especial, Fábio (Urso), Ciro, João Paulo (Xixi), Alexandre (Paranaguá), Patrícia (Paty), as meninas do laboratório de perifíton e a galera do futebol.

A todos do Laboratório de Genética e colegas do curso de Pós-Graduação pela amizade. Em especial a Thaís, Vivian, Talge, Léia e Tati, que estiveram mais presentes nas etapas finais.

Aos pescadores do Nupélia, e demais funcionários pelo apoio e atendimento.

Aos funcionários do DBC, em especial ao Donizete, Maria José e Leila pelo auxílio na parte técnica.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, pelos ensinamentos obtidos.

E todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

Caracterização molecular de espécies de *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil: variabilidade e diferenciação genética, hibridação e filogeografia

RESUMO

As raias da família Potamotrygonidae são peixes cartilagosos de origem marinha que invadiram a bacia Amazônica durante o mioceno. Existem outras espécies de água doce, como por exemplo, as raias da família Dasyatidae, mas apenas as raias da família Potamotrygonidae estão totalmente adaptadas e apresentam todo seu ciclo de vida em água doce. Existem três gêneros em Potamotrygonidae. *Paratrygon* e *Plesiotrygon* com apenas uma espécie cada, e *Potamotrygon* com 18 espécies e outras a serem descritas. A bacia amazônica apresenta a maior diversidade de espécies, com 13 espécies descritas, enquanto que a bacia Paraná- Paraguai apresenta sete espécies. A maioria das espécies são endêmicas, com poucas espécies habitando mais de uma bacia hidrográfica, como por exemplo, *P. motoro*. No alto rio Paraná existem duas espécies, *P. motoro* e *P. falkneri*, que invadiram esse ambiente após a construção de Itaipu. No presente trabalho foram avaliadas a variabilidade genética e a diferenciação genética das espécies presentes no alto rio Paraná, a possibilidade de hibridação inter-específica e a comparação entre indivíduos de *P. motoro* do alto rio Paraná com indivíduos do rio Orinoco e da bacia Amazônica. Ambas as espécies, *P. motoro* e *P. falkneri*, apresentaram baixa diversidade genética, entretanto, com alguns marcadores moleculares, foram identificados dois grupos bem diferenciados em *P. falkneri*. Esse resultado deve ser melhor estudado para confirmar a sua validade. A diferenciação genética entre as duas espécies também foi muito baixa, fato que ressalta a especiação recente dessas duas espécies. Foram detectados indivíduos híbridos entre *P. motoro* e *P. falkneri* no alto rio Paraná. A comparação entre as populações de *P. motoro* do alto rio Paraná, rio Orinoco e bacia Amazônica mostrou que estas populações não pertencem à mesma espécie. Portanto, *P. motoro* deve ser considerado um complexo de espécies, e sua identificação restrita a populações da bacia Paraná- Paraguai, local de sua descrição.

Palavras-chave: Raia. Diversidade genética. Diferenciação genética. Hibridação. Complexo de espécies. mtDNA

Molecular characterization of *Potamotrygon* species (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) from the Upper Paraná River floodplain, Brazil: variability and genetic differentiation, hybridization and phylogeography

ABSTRACT

The freshwater stingrays from the Potamotrygonidae family are cartilaginous fish of marine origins that invaded the Amazon basin during the Miocene. There are other freshwater species, such as from the Dasyatidae family, but only the stingrays of the Potamotrygonidae are fully adapted and have all their life cycle in freshwater. There are three genus in Potamotrygonidae. *Paratrygon* and *Plesiotrygon* with only one species each, and *Potamotrygon* with 18 species and others to be described. The Amazon basin has the highest diversity of species, with 13 described species, while the Paraná- Paraguay basin has seven species. Most species are endemic, with few species inhabiting more than one basin, for example, *P. motoro*. In the Upper Paraná River, there are now two species, *P. motoro* and *P. falkneri*, which invaded this environment after the construction of Itaipu. In this study we evaluated the genetic variability and genetic differentiation of the potamotrygonids in the Upper Paraná River, the possibility of interspecific hybridization and comparison between populations of *P. motoro* from the Upper Paraná River, Orinoco River and the Amazon basin. Both species, *P. motoro* and *P. falkneri* showed low genetic diversity, however, with some molecular markers, two groups were identified in *P. falkneri*. More studies are required to confirm this result. The genetic differentiation between the two species was also very low, emphasizing the recent speciation of these two species. Hybrid individuals were detected between *P. motoro* and *P. falkneri* in the Upper Paraná River. The analysis between the populations of *P. motoro* from the Upper Paraná River, Orinoco River and the Amazon basin showed that these populations do not belong to the same species. Therefore, *P. motoro* should be considered a species complex, and their identification restricted to the Paraná- Paraguay basin, where were described.

Keywords: Stingray. Genetic diversity. Genetic differentiation. Hybridization. species complex.

Tese elaborada e formatada conforme as normas da revista científica *Journal of Fish Biology*. Disponível em: <<http://www.wiley.com/bw/submit.asp>>

SUMÁRIO

Capítulo I - Caracterização molecular das espécies de *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) do alto rio Paraná, Brasil: variabilidade, diferenciação genética e hibridação

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Coletas.....	16
Extração de DNA.....	17
Amplificações via PCR.....	17
DNA mitocondrial (mtDNA).....	17
<i>ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)</i>	18
RESULTADOS.....	19
DNA mitocondrial	
Região controle (<i>D-Loop</i>).....	21
Citocromo b (<i>Cyt b</i>).....	24
Citocromo c Oxidase I (<i>COI</i>).....	27
<i>ATPase 8/6</i>.....	29
DNA nuclear	
<i>ISSR</i>.....	32
DISCUSSÃO.....	35
Avaliação da diferenciação genética.....	35
Avaliação da diversidade genética intra-específica.....	36
Avaliação do processo de hibridação.....	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

Capítulo II - Comparação genética baseada em sequências mitocondriais *Cyt b* e *COI* entre *Potamotrygon motoro* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) do alto rio Paraná, rio Orinoco e bacia Amazônica

RESUMO	45
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	47
MATERIALE MÉTODOS	48
Extração de DNA	48
Amplificações do DNA mitocondrial (mtDNA)	49
RESULTADOS	49
Citocromo b (<i>Cyt b</i>)	49
<i>Citocromo c Oxidase I (COI)</i>	53
DISCUSSÃO	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	59

Capítulo I - Caracterização molecular das espécies de *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) do alto rio Paraná, Brasil: variabilidade, diferenciação genética e hibridação

RESUMO

A família Potamotrygonidae, representada pelas raias de água doce, é a única família de Elasmobrânquios exclusivamente de água doce. *Potamotrygon* é o gênero com maior número de espécies. As principais características para identificar as espécies de potamotrigonídeos são o padrão de coloração e manchas dorsais. Entretanto, devido ao policromatismo e sobreposições merísticas e morfométricas, são comuns problemas de identificação nesse gênero. No alto rio Paraná, originalmente não era encontrada nenhuma espécie de raia, porém, com a construção de Itaipu, e conseqüente submersão do salto Sete Quedas, *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* invadiram e colonizaram o alto rio Paraná. Alguns trabalhos avaliaram características ecológicas desses potamotrigonídeos na planície de inundação do alto rio Paraná. Entretanto, conflitos quanto à correta identificação ainda ocorrem nessa região. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar e caracterizar geneticamente, através das sequências mitocondriais *D-Loop*, *Cyt b*, *COI* e *ATPase 8/6* e marcadores *ISSR*, as espécies de raia do alto rio Paraná. Foram analisados geneticamente 49 indivíduos, capturados nos anos de 2007 e 2008. Os resultados mostraram a presença de duas espécies de raia muito próximas geneticamente. Foram identificados dois grupos de *P. falkneri* bem diferenciados geneticamente. Entretanto, a diversidade genética intra-específica foi baixa para ambas as espécies. Foram identificados quatro indivíduos híbridos *P. motoro* x *P. falkneri*. Os híbridos apresentam sequências mitocondriais de *P. falkneri* e morfologia e DNA nuclear de *P. motoro*. Dessa forma, ficou evidenciado a possibilidade do processo de introgressão gênica através de retrocruzamento.

Palavras-chave: *ATPase 8/6*, *COI*, *Cyt b*, *D-Loop*, *ISSR*, Raia de água doce.

Chapter I – Molecular characterization of *Potamotrygon* species (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) from the Upper Paraná River, Brazil: variability, genetic differentiation and hybridization

ABSTRACT

The Potamotrygonidae family, represented by freshwater stingrays, is the only family of Elasmobranchs living exclusively in freshwater. *Potamotrygon* is the genus with largest number of species. The main characteristics to identify the species of potamotrygonids are the color pattern and dorsal spots. However, due to the polychromatism and overlapping in the morphology, identifying problems are common. In the Upper Paraná River, there wasn't any species of freshwater stingrays originally, but with the construction of Itaipu dam, and consequent submersion of Sete Quedas Falls, *Potamotrygon motoro* and *Potamotrygon falkneri* invaded and colonized the upper Paraná river. Some works has investigated the ecological characteristics of the potamotrygonids in the Upper Paraná River floodplain. However, conflicts about the correct identification still occur in this region. The aim of the present study was to evaluate and characterize genetically by mitochondrial sequences of *D-Loop*, *Cyt b*, *COI*, *ATPase 8/6* and *ISSR* markers, species of freshwater stingrays from the upper Paraná river. Were genetically analyzed 49 individuals collected in the years of 2007 and 2008. The results showed the presence of two species of stingrays very genetically related. We identified two groups of *P. falkneri* very genetically differentiated. However, the intraspecific genetic diversity was low for both species. We identified four hybrids *P. motoro* x *P. falkneri*. The hybrids have mitochondrial sequences similar to *P. falkneri* and morphology and nuclear DNA of *P. motoro*. Thus, was evidenced the possibility of gene introgression by backcrossing.

Keywords: *ATPase 8/6*, *COI*, *Cyt b*, *D-Loop*, Freshwater stingrays, *ISSR*

INTRODUÇÃO

As raias, ou arraias, sul-americanas de água doce são peixes com características bem diferentes dos demais. Ao contrário dos outros peixes habitualmente encontrados em ambientes aquáticos continentais, as raias pertencem à classe Chondrichthyes por apresentarem esqueleto cartilaginoso, presença de escamas placóides e cláspes, e pertencem à subclasse Elasmobranchii.

Os Elasmobrânquios são animais predominantemente marinhos. A única família exclusivamente de água doce é a Potamotrygonidae (Carvalho *et al.*, 2003). Essa família é claramente monofilética (Carvalho *et al.*, 2003) e compartilham especiações morfológicas e fisiológicas únicas. As principais características que distinguem a família dos demais elasmobrânquios são: hábitat exclusivamente continental, presença de um processo pré-pélvico, sangue com baixa concentração de uréia, glândula retal atrofiada e a quantidade muito maior de células secretoras de muco na cauda (Rosa, 1985; Carvalho *et al.*, 2003). Thorson, *et al.* (1983) relatam que as raias de água doce são os elasmobrânquios mais bem adaptados para a vida na água doce, por serem capazes de realizar osmorregulação, assim como os Actinopterygii de água doce fazem, e por não concentrar uréia como os elasmobrânquios marinhos.

A família Potamotrygonidae está dividida em três gêneros – *Potamotrygon*, com aproximadamente 18 espécies válidas e, certamente, várias não descritas (Charvet-Almeida *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2009), *Paratrygon* e *Plesiotrygon*, com apenas uma espécie cada gênero. Segundo Carvalho *et al.* (2003) algumas espécies válidas, como por exemplo, *P. motoro*, podem requerer uma subdivisão depois de estudos adicionais. Os indivíduos dessa família são animais de médio a grande porte e caracterizam-se por serem ovovivíparos, alimentarem-se predominantemente de insetos aquáticos, crustáceos, moluscos e peixes e possuem o corpo e a cabeça deprimidos em forma de disco. Suas nadadeiras peitorais são modificadas, formando uma borda ao redor do disco, unindo-se na parte anterior do focinho. Na região ventral está localizada a boca com várias papilas e placas dentais (Britski *et al.*, 1999) as quais, segundo Castex (1967), servem para separar suas espécies em grupos.

A maioria dos potamotrigonídeos apresentam arranjos dorsais coloridos, incluindo-se pontos de várias dimensões, ocelos, marcas vermiformes e padrões de reticulado, que são geralmente espécie-específicos (Carvalho *et al.*, 2003). Um dos mais importantes caracteres utilizados na identificação dos elasmobrânquios é o padrão de colorido dorsal. Entretanto, as espécies do gênero *Potamotrygon* apresentam muitas variações intra-específicas na coloração, combinadas com sobreposições merísticas e morfométricas (Carvalho *et al.*, 2003). Esses podem ser indicativos da existência de híbridos interespecíficos, e ainda diferenças em etapas do ciclo de vida e dimorfismo sexual.

Na planície de inundação do alto rio Paraná, até o início da década de 80, não existia nenhuma espécie de raia. Porém, após o fechamento das comportas da usina hidrelétrica de Itaipu, houve a eliminação dos saltos de Sete Quedas, que agiam como barreira geográfica e ecológica. Com isso, um trecho de aproximadamente 150 km do médio rio Paraná passou a integrar o alto rio Paraná, e espécies de peixes que não habitavam o alto Paraná, passaram a habitá-lo (Agostinho *et al.*, 1992). Segundo Júlio-Jr. *et al.* (2009), 33 espécies de peixe nativas do médio Paraná invadiram e colonizaram com sucesso o alto Paraná, entre elas duas espécies de raia – *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*. *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841), é descrita do rio Cuiabá, bacia do Paraguai, Brasil (Carvalho *et al.*, 2003) e apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco e do Prata (Araújo *et al.*, 2004). *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963, localidade-tipo rio Paraná, porto da cidade de Santa Fé, Argentina (Carvalho *et al.*, 2003), encontra-se distribuída nas bacias do rio Paraguai e alto rio Paraná (Araújo *et al.*, 2004).

Estudos anteriores demonstraram haver conflitos quanto à correta identificação dos exemplares de raia no alto rio Paraná. Silva (2006) encontrou dois grupos de *P. motoro* com características morfométricas muito diferentes. Lonardoní (2009) detectou dois grupos ecomorfológicos distintos de *P. falkneri* nos rios Paraná e Baía, provavelmente relacionados com o tipo de alimentação. Nessa região, os caracteres comumente utilizados na taxonomia do grupo, como por exemplo, presença de sulco labial, número de séries de espinhos na cauda e diferenças na coloração não têm sido efetivos na diferenciação das espécies. Exemplares com colorido intermediário entre as espécies *P. motoro* e *P. falkneri*, pode ser um indicativo de hibridação natural, ou policromatismo intra-específico.

Os marcadores moleculares baseados em DNA constituem ferramentas auxiliares na identificação de espécies crípticas e no reconhecimento de híbridos entre espécies (Awise, 2004; Oliveira *et al.*, 2002; 2006), podendo contribuir para a obtenção de informações sobre a diversidade genética intra e interespecífica de raias do gênero *Potamotrygon* da bacia do rio Paraná.

Técnicas moleculares associadas a análises morfológicas e ecológicas têm sido aplicadas, com eficácia, à sistemática de peixes. Marcadores moleculares também têm sido amplamente utilizados para caracterizar a biodiversidade e a estrutura genética de populações de peixes. Entre as metodologias de análise molecular, aquelas baseadas em fragmentos de DNA amplificados com a técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tornaram possíveis estudos genético-moleculares envolvendo um grande número de indivíduos.

O marcador molecular nuclear ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), utiliza um único *primer* com a sequência tetranucleotídica repetitiva de um microssatélite ou SSR (*Single Sequence Repeats*), permitindo amplificar o segmento genômico que se encontra entre dois blocos de microssatélite. O resultado pode ser interpretado como um mapeamento de tais sequências repetitivas. Estes fragmentos amplificados constituem marcadores estáveis e com pouca variação intra-específica, enquanto são frequentemente encontrados polimorfismos entre espécies diferentes.

O DNA mitocondrial (mtDNA) exibe algumas particularidades que permitem o acúmulo rápido de mutações de ponto, que favorecem a identificação de variações entre indivíduos (Brown, 1983). O sequenciamento da região controle de origem de replicação do mtDNA, também conhecida como *D-Loop*, é útil em estudos de filogenia, filogeografia e caracterização do polimorfismo de populações, inclusive em peixes (Faber & Stepien, 1977; Meyer, 1994; Prioli *et al.*, 2002; Avise, 2004) e espécies próximas de difícil identificação (Meyer, 1994; Prioli *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002) em função de ser muito variável e apresentar alta taxa de mutação (Meyer, 1994).

O gene mitocondrial citocromo c oxidase I (*COI*), por apresentar certas características, como ser eficiente em discriminar espécies e por apresentar uma sequência conservada que facilita a utilização de *primers* universais (Hebert *et al.*, 2003) foi selecionada para a construção de um banco de dados de códigos de barras de DNA (*DNA barcode*), com o objetivo de identificar espécies ainda não identificadas e aumentar a taxa de descoberta de novas espécies (Moritz & Cicero, 2004). A metodologia do *DNA barcode*, segundo seus idealizadores, é uma forma rápida eficiente e de acesso global para delimitação e identificação de novas espécies (Hebert *et al.*, 2003). Essa metodologia está baseada na premissa de que a diversidade interespecífica é sempre maior do que a diversidade intra-específica. Hebert *et al.* (2004), propuseram um limiar em que espécies diferentes devem apresentar a diversidade interespecífica 10 vezes maior do que a diversidade intra-específica.

Outras regiões do mtDNA comumente utilizadas em estudos genético-ecológicos são as que codificam os genes citocromo b (*Cyt b*) e *ATPase 8/6*. Porém, estas regiões são mais conservadas e não detectam pequenas variações nas sequências nucleotídicas. As sequências do gene *Cyt b* contém sinais filogenéticos em vários níveis taxonômicos, inclusive em peixes (Kocher & White, 1989; Meyer *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1992; Cantatore *et al.* 1994; García *et al.*, 2000; Avise, 2004). Essas sequências também são bastante utilizadas como "relógio molecular" para estimar a cronologia da especiação (Meyer *et al.*, 1990; Irwin *et al.*, 1991; Smith & Patton, 1993; Avise, 2004). O gene da *ATPase 8/6* é bastante utilizado em estudos de filogenia, sistemática

molecular e filogeografia (Bermingham & Martin, 1998; Machordon & Doadrio, 2001; Perdices & Doadrio, 2001; Wong *et al.*, 2004).

Sendo assim, o objetivo proposto neste trabalho foi identificar e caracterizar molecularmente, através de marcadores mitocondriais e nucleares, as espécies de *Potamotrygon* no alto rio Paraná, bem como, esclarecer algumas dúvidas quanto à possibilidade de existência de complexos de espécies e hibridação natural entre os potamotrigonídeos dessa região.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas

As coletas de exemplares de *Potamotrygon* foram realizadas em dois pontos no alto rio Paraná. Na planície de inundação do alto rio Paraná, próximo à cidade de Porto Rico - PR, e no reservatório da usina de Itaipu, próximo à cidade de Foz do Iguaçu, nos anos de 2007 e 2008 (Fig. 1). Os exemplares foram identificados de acordo com o padrão de coloração e manchas dorsais. Foram coletados 28 indivíduos de *P. motoro* e 21 de *P. falkneri*. Foram realizadas duas coletas específicas para a captura de raias e alguns exemplares foram capturados nas campanhas do projeto PELD/CNPq. As capturas nas coletas específicas foram realizadas com o auxílio de fisga, e os indivíduos coletados no PELD foram capturados com espinhel.

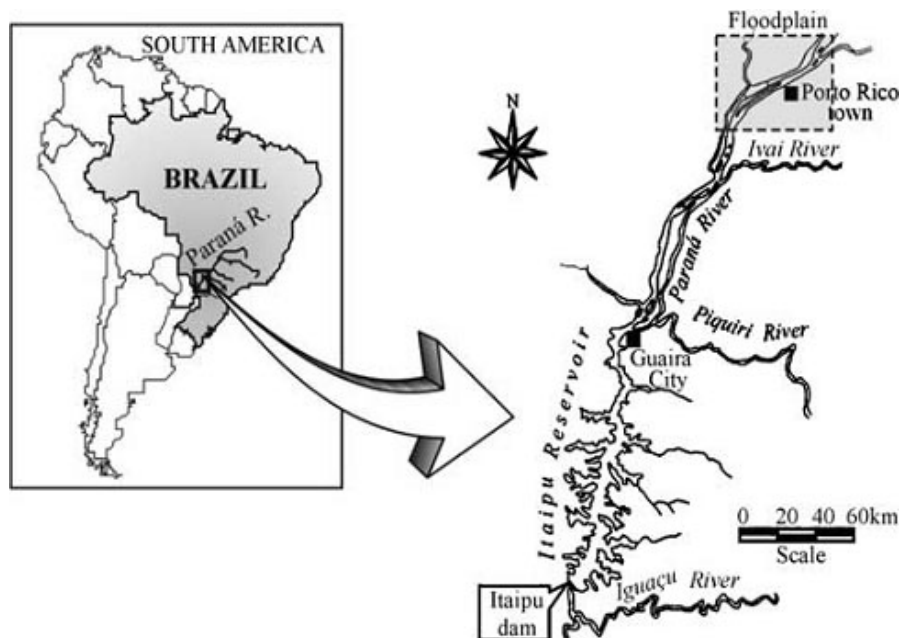


Figura 1: Mapa indicando as áreas de amostragem dos exemplares de *P. motoro* e *P. falkneri*. Em destaque os dois pontos de coletas: Reservatório de Itaipu e planície de Inundação do alto rio Paraná.

De cada indivíduo foi retirada uma amostra de músculo da região lateral do corpo. As amostras foram preservadas em frascos com álcool comercial puro e armazenadas em freezer –

20°C. Após a retirada de músculo para a extração do DNA, a maioria dos exemplares foram fixados em formol e depositados na Coleção Ictiológica do NUPÉLIA.

Extração de DNA

O DNA total foi extraído baseado no método fenol-clorofórmio (Monesi *et al.* 1998), com modificações. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%), tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Espermidina 0,15 mM) e proteinase K (20 µg/µL) por 2 horas em banho-maria a 37°C.

Posteriormente o DNA foi purificado por extração com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio, respectivamente e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado. O tubo foi suavemente invertido para precipitar o DNA, a suspensão foi centrifugada por 10 min a 13.000 rpm e descartado o sobrenadante. O pellet foi lavado com etanol 70% gelado e centrifugado por 2 min. Depois de seco, o DNA foi ressuspensão em 50 µL de tampão TE diluído 10 vezes (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM). A suspensão de DNA foi armazenada a -20°C. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para quantificação do DNA, por comparação com uma amostra conhecida de DNA λ de concentrações de 25, 50 e 100 ng, em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL).

Amplificações via PCR

DNA mitocondrial (mtDNA)

A região controle (*D-Loop*) do genoma mitocondrial e também os genes citocromo b (*Cyt b*), citocromo c oxidase I (*COI*) e *ATPase 8/6* foram amplificadas via PCR. As amplificações foram realizadas a partir de amostras de DNA total, de acordo com Prioli *et al.* (2002). Foram utilizados os pares de *primers* L-Thr e H-Phe para o *Dloop*, o L-14841 e H-15551 para o *Cyt b*, COI-F e COI-R para o *COI* e L-8331 e H-9236 para a *ATPase8/6*. A mistura de reação de amplificação consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 2,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U/Reação de *Taq* DNA polimerase, DNA genômico 30 ng e água deionizada e autoclavada para completar 25 µL. A obtenção dos fragmentos de interesse foi realizada em um ciclo inicial de 4 min a 94°C, 30 s a 50°C e 1 min e 30 s a 72°C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C e 1 min e 30 s a 72°C, e um último ciclo de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C e 7 min a 72°C.

Cerca de 100 ng de DNA do produto final de cada reação de PCR foram usados diretamente como molde para sequenciamento em plataforma MegaBace (Amersham[®]), seguindo instruções do fabricante. As sequências nucleotídicas, sob o formato de cromatograma, foram editadas no programa BIOEDIT (Hall, 1999) e alinhadas com o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Para a estimativa dos parâmetros da diversidade intra-específica foram obtidos o número de haplótipos e os índices de diversidades haplotípica e nucleotídica com o programa DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009) e a distância genética não corrigida “p” entre indivíduos da mesma espécie, com o programa Mega 4.0.1 (Tamura *et al.*, 2007).

Utilizando-se os procedimentos Akaike Information Criterion corrigido (AICc) e Bayesian Information Criterion (BIC) do programa Modeltest 3.7 (Posada e Crandall, 1998), foi determinado, por máxima verossimilhança, o modelo mais ajustado aos dados. A diferenciação entre as espécies foi inferida de dendrogramas *neighbor-joining*, construídos com os programas Paup 4.0b4 (Swofford, 2002) e Mega 4.0.1 (Tamura *et al.*, 2007), do gráfico de dispersão dos haplótipos em coordenadas principais, com o programa Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., 2005), após correção de Lingo (Legendre & Anderson, 1999) e da tabela de distância genética não corrigida “p”, construída com o programa Mega 4.0.1 (Tamura *et al.*, 2007).

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

As condições de amplificação do *ISSR*, via PCR, foram as recomendadas por Fernandes-Matioli *et al.* (2000). foram utilizados os *primers* (CCTA)₄, (GGAC)₃A, (TGTC)₄ e (GGAC)₃T nas amplificações dos fragmentos *ISSR*. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados sob radiação UV. Cada indivíduo produziu um perfil eletroforético com determinado *primer*. A partir da presença ou ausência de bandas no gel, foi construída uma tabela de ausência (0) e presença (1).

Para estimar os parâmetros da diversidade intra-populacional foram calculados o número de haplótipos e de sítios polimórficos para cada espécie utilizando o programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) e a distância de Jaccard entre indivíduos da mesma espécie, com o programa FreeTree (Pavlicek *et al.*, 1999).

Para estimar a diferenciação genética entre as espécies de raia do alto rio Paraná foram calculados a distância genética de Jaccard entre indivíduos de espécies diferentes e o índice de fixação molecular F_{st} com o programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Foram construídos o dendrograma *neighbor-joining*, com o programa FreeTree (Pavlicek *et al.*, 1999) e Mega 4.0.1 (Tamura *et al.*, 2007) e o gráfico de dispersão em coordenadas principais, após correção de

Lingoes (Legendre & Anderson, 1999), utilizando o programa DistPCoA (Legendre & Anderson, 1998) para caracterização das diferenças genéticas entre as espécies.

RESULTADOS

Foram estudados indivíduos com morfologia característica de *P. motoro*, *P. falkneri*, e indivíduos com características bem diferentes das duas espécies. Esses indivíduos apresentaram manchas dorsais quase imperceptíveis e coloração bem escura. Com base apenas em características morfológicas, não foi possível identificar todos os exemplares. Posteriormente, as análises moleculares permitiram a identificação de todos os indivíduos. *Potamotrygon motoro* apresentou maior variabilidade na coloração e formato das manchas dorsais, apesar de *P. falkneri* também apresentar certa variação morfológica (Fig. 2).

PTG 37



PTG 43



PTG 46



PTG 52



PTG 35



PTG 53



Figura 2: Policromatismo intra-específico em exemplares de *Potamotrygon* do alto rio Paraná. (PTG 37) *P. motoro* de corpo escuro e com poucas manchas quase imperceptíveis; (PTG 43) *P. motoro* de corpo marrom com poucas manchas; (PTG 46) *P. motoro* com muitos ocelos distribuídos uniformemente; (PTG 52) *P. motoro* com ocelos grandes e espaçados; (PTG 35) *P. falkneri* com arranjos vermiformes; (PTG 53) *P. falkneri* com muitas manchas arredondadas lembrando ocelos.

DNA mitocondrial

Região controle (*D-Loop*)

Foram amplificados e sequenciados fragmentos de DNA correspondentes a região *D-Loop* de 11 exemplares de *P. motoro* e 14 de *P. falkneri* no alto rio Paraná. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 1.800 pares de bases (pb), correspondente à parte do *tRNA-Thr* e *tRNA-Phe*, e o *tRNA-Pro* e *D-Loop* completos. Após o alinhamento, foram obtidas sequências de 485 pb correspondentes a porção hipervariável do *D-Loop*. Essa região apresentou frequências nucleotídicas de A= 0,361; T= 0,327; C= 0,239 e G= 0,072 e taxa de transição/transversão de 4,463. A análise de escolha do modelo evolutivo que melhor explica as variações nas sequências *D-Loop* indicou o modelo HKY como o mais adequado.

Os resultados obtidos no dendrograma *neighbor-joining* e no gráfico de dispersão, demonstraram a formação de três grupos de *Potamotrygon*, denominados de: *P. motoro*, *P. falkneri* e *P. falkneri 2* (Figs. 3 e 4). Foram observados sete *indels* e 18 pontos de substituições nucleotídicas, sendo 11 exclusivos de um dos grupos, sendo quatro exclusivos de *P. motoro*, três de *P. falkneri* e quatro de *P. falkneri 2*.

Dois indivíduos preliminarmente identificados como *P. motoro* através de características morfológicas, apresentaram a sequência do *D-Loop* característicos de *P. falkneri*, sendo agrupados juntos com os demais indivíduos de *P. falkneri* no dendrograma e gráfico de dispersão (Figs. 3 e 4). Esses indivíduos foram identificados como híbridos *P. motoro* x *P. falkneri*, por apresentar aparência de *P. motoro* e sequência *D-Loop* de *P. falkneri*.

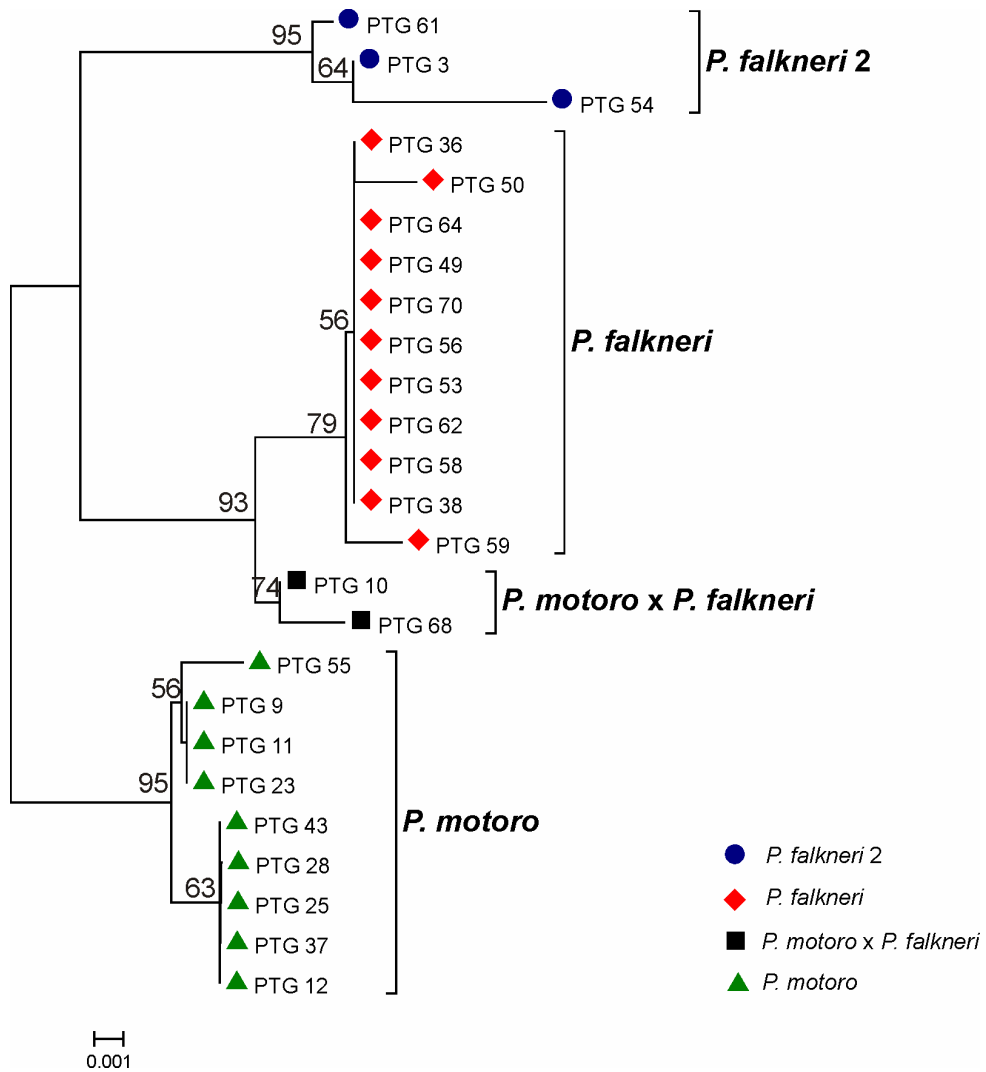


Figura 3: Dendrograma *neighbor-joining*, com 10.000 reamostragens *bootstrap*, baseado na matriz de distância genética calculado com o modelo HKY de seqüências do *D-Loop* de espécimes de *Potamotrygon* do alto rio Paraná.

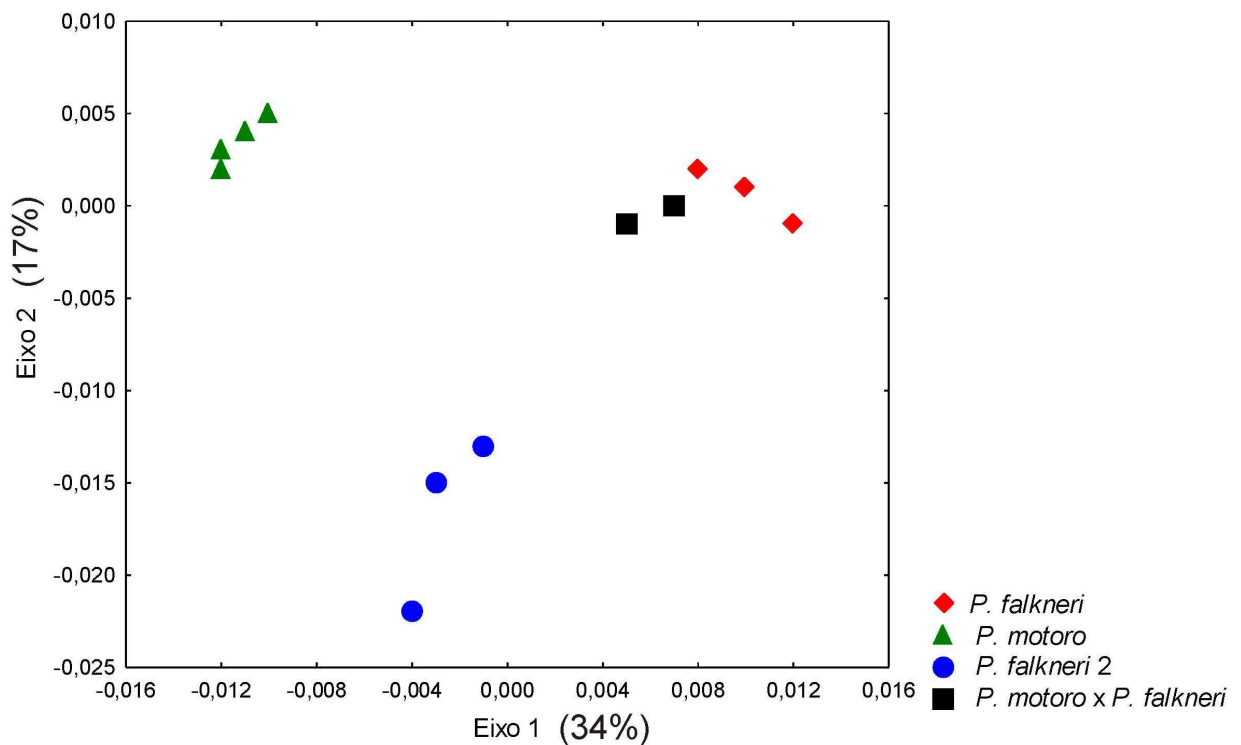


Figura 4: Gráfico de dispersão dos dois primeiros eixos da análise de coordenadas principais de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná, baseado nos autovetores calculados após correção de Lingoes a partir da matriz de distância genética HKY de sequências do *D-Loop*.

As médias das distâncias genéticas obtidas das sequências *D-Loop* dos indivíduos dos três grupos variaram de 1,8% a 2%. O menor valor foi observado entre *P. motoro* e *P. falkneri* e os maiores valores entre *P. falkneri 2* e os outros dois grupos estudados (Tabela 1).

Tabela 1: Média dos valores de distância genética não corrigida “p” entre indivíduos de *P. motoro*, *P. falkneri* e *P. falkneri 2* do alto rio Paraná, baseados em sequências do *D-Loop*.

	<i>P. motoro</i>	<i>P. falkneri</i>
<i>P. falkneri</i>	0,018	
<i>P. falkneri 2</i>	0,020	0,020

A análise de diversidade intra-específica a partir das sequências *D-loop* demonstrou que o grupo *P. falkneri 2*, apesar de ter apenas três indivíduos, apresentou os maiores valores de diversidade nucleotídica, haplotípica e distância “p”. Para *P. falkneri* foi observado o maior número de haplótipos, entretanto, apresentou menor diversidade haplotípica e diversidade

nucleotídica intermediária. *P. motoro* apresentou diversidade haplotípica intermediária e menor valor de diversidade nucleotídica (Tabela 2).

Tabela 2: Índices de Diversidade intra-específica obtidos a partir de sequências do *D-Loop* de exemplares de *Potamotrygon* do alto rio Paraná. *N*= número de sequências; *h*= número de haplótipos; *Hd*= diversidade haplotípica; *Pi*= diversidade nucleotídica; “*p*”= distância genética não corrigida.

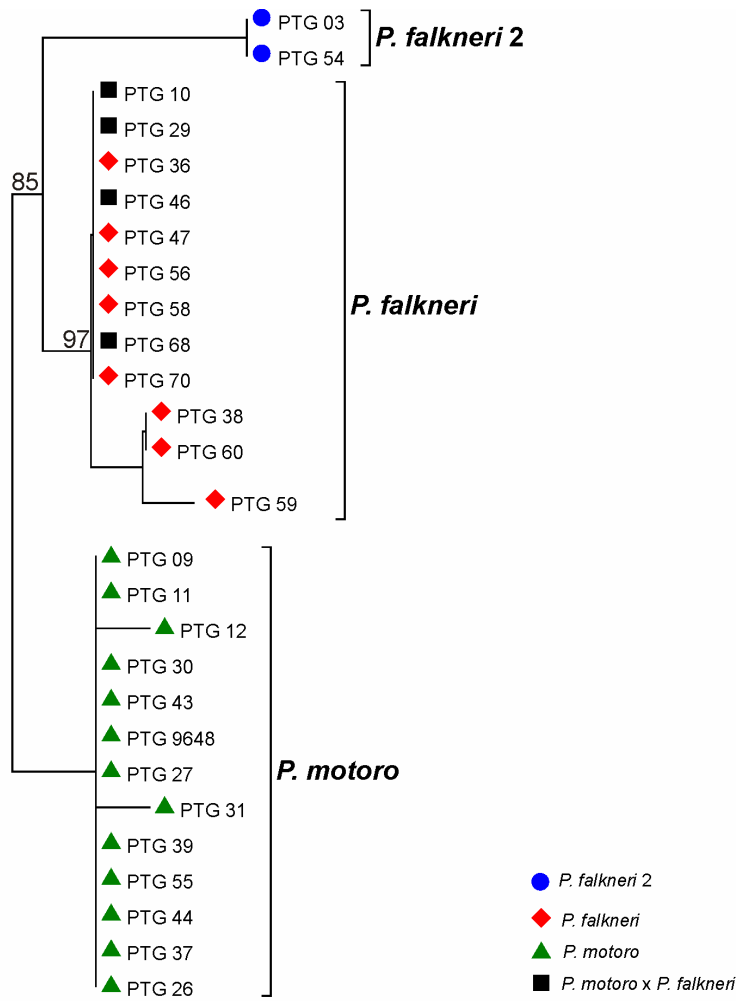
	<i>P. motoro</i>	<i>P. falkneri</i>	<i>P. falkneri 2</i>
<i>N</i>	9	13	3
<i>h</i>	3	5	3
<i>Hd</i>	0,64	0,54	1,00
<i>Pi</i>	0,0016	0,0025	0,0056
“ <i>p</i> ”	0,002	0,002	0,006

Citocromo b (*Cyt b*)

Foi amplificado e sequenciado uma sequência parcial do gene citocromo b (*Cyt b*) de 13 exemplares de *P. motoro* e 14 de *P. falkneri* no alto rio Paraná. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb). Após o alinhamento, foram obtidas sequências de 638 pb. Essa sequência apresentou frequências nucleotídicas de A= 0,287; T= 0,283; C= 0,303 e G= 0,127 e taxa de transição/transversão de 13,8. A análise de escolha do modelo evolutivo que melhor explica as variações nas sequências *Cyt b* indicou o modelo HKY como o mais adequado.

Os resultados obtidos no dendrograma *neighbor-joining* e no gráfico de dispersão confirmaram os resultados obtidos com o *D-Loop* e também mostraram a formação dos mesmos três grupos (fig.5 e Fig.6). Foram observados 11 pontos de substituições nucleotídicas, sendo que destes, dois foram exclusivos de *P. motoro*, um de *P. falkneri* e quatro de *P. falkneri 2*.

Quatro indivíduos preliminarmente identificados como *P. motoro* através de características morfológicas apresentaram a sequência do *Cyt b* característica de *P. falkneri*, inclusive compartilhando o mesmo haplótipo encontrado para cinco indivíduos de *P. falkneri* e ficaram agrupados juntos com os demais indivíduos de *P. falkneri* no dendrograma e gráfico de dispersão (Figs. 5 e 6). Assim como nas análises do *D-Loop*, esses indivíduos foram identificados como híbridos *P. motoro* x *P. falkneri*, por apresentar características morfológicas de *P. motoro* e sequência do gene mitocondrial *Cyt b* de *P. falkneri*.



0.001

Figura 5: Dendrograma *neighbor-joining*, com 10.000 reamostragens *bootstrap*, baseado na matriz de distância genética calculado com o modelo HKY de sequências do gene *Cyt b* de espécimes de *Potamotrygon* do alto rio Paraná.

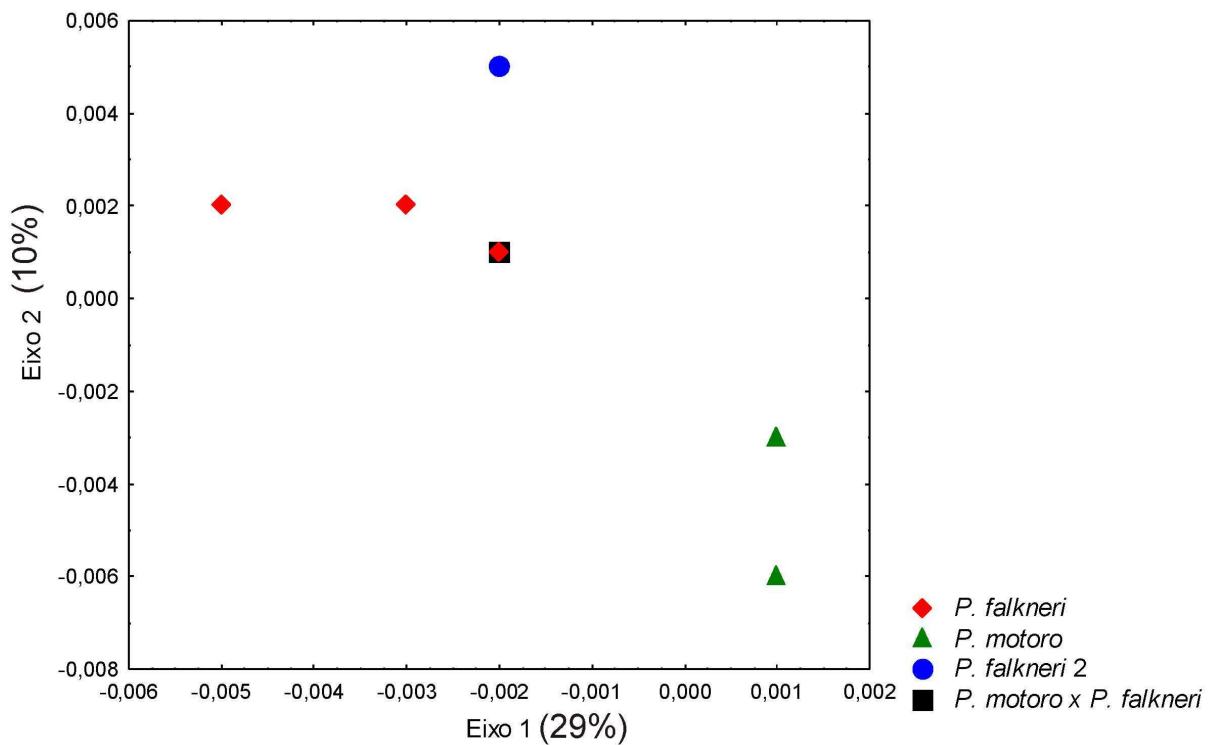


Figura 6: Gráfico de dispersão dos dois primeiros eixos da análise de coordenadas principais de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná, baseado nos autovetores calculados após correção de Lingoes a partir da matriz de distância genética HKY de sequências dos genes *Cyt b*.

As médias das distâncias genéticas a partir das sequências do *Cyt b* dos indivíduos dos três grupos variaram de 0,5% a 0,9%. O menor valor foi observado entre *P. motoro* e *P. falkneri* e os maiores valores entre *P. falkneri* 2 e os outros dois grupos estudados (Tabela 3).

Tabela 3: Média dos valores de distância genética não corrigida “p” entre indivíduos de *P. motoro*, *P. falkneri* e *P. falkneri* 2 do alto rio Paraná, baseados em sequências do gene *Cyt b*.

	<i>P. motoro</i>	<i>P. falkneri</i>
<i>P. motoro</i>		
<i>P. falkneri</i>	0,005	
<i>P. falkneri</i> 2	0,009	0,009

A análise de diversidade intra-específica a partir das sequências de *Cyt b* demonstrou que *P. motoro* apresentou os maiores valores de diversidade nucleotídica, distância “p” e número de haplótipos. Em *P. falkneri* foi observado o maior valor de diversidade haplotípica. Foram analisados apenas dois indivíduos de *P. falkneri* 2, pertencentes ao mesmo haplótipo, por isso, esse grupo não apresentou diversidades haplotípica, nucleotídica e distância “p” (Tabela 4).

Tabela 4: Índices de Diversidade intra-específica obtidos a partir de sequências do gene *Cyt b* de exemplares de *Potamotrygon* do alto rio Paraná. *N*= número de sequências; *h*= número de haplótipos; *Hd*= diversidade haplotípica; *Pi*= diversidade nucleotídica; “p”= distância genética não corrigida.

	<i>P. motoro</i>	<i>P. falkneri</i>	<i>P. falkneri 2</i>
<i>N</i>	13	12	2
<i>h</i>	4	3	1
<i>Hd</i>	0,42	0,44	0,000
<i>Pi</i>	0,0012	0,0009	0,000
“p”	0,003	0,001	0,000

Citocromo c Oxidase I (*COI*)

Foram amplificados e sequenciados um fragmento parcial do gene citocromo c oxidase I (*COI*) de cinco exemplares de *P. motoro* e nove de *P. falkneri* no alto rio Paraná. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 800 pares de bases (pb). Após o alinhamento, foram obtidas sequências de 474 pb. Essa sequência apresentou uma frequência nucleotídica de A=0,278; T=0,291; C=0,258 e G=0,173 e taxa de transição/transversão de 13,46. O modelo HKY foi selecionado como o mais adequado para explicar as variações nas sequências *COI*.

Os resultados obtidos no dendrograma *neighbor-joining* e no gráfico de dispersão, demonstraram que os indivíduos foram classificados em apenas dois grupos, pois o único exemplar do grupo *P. falkneri 2* que teve o gene *COI* sequenciado não apresentou nenhuma diferença em relação às sequências dos indivíduos de *P. falkneri* (Figs. 7 e 8). Não foi possível sequenciar o gene *COI* de nenhum indivíduo do grupo *P. motoro* x *P. falkneri*. Foram observados 10 pontos de substituições nucleotídicas, sendo sete exclusivos para um dos dois grupos analisados.

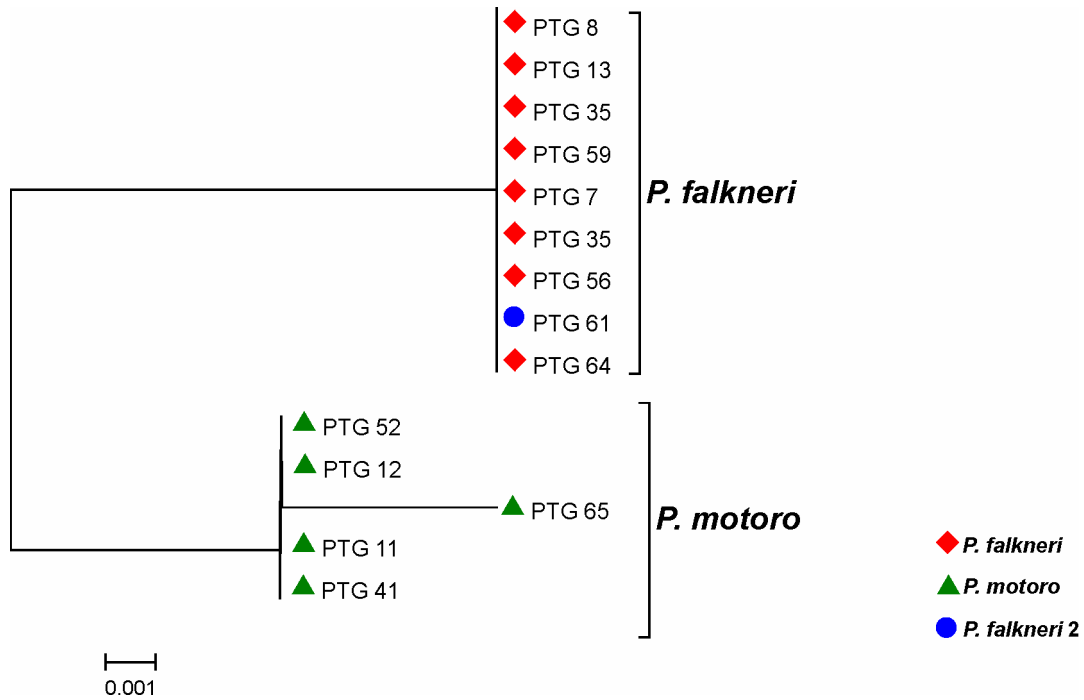


Figura 7: Dendrograma *neighbor-joining*, com 10.000 reamostragens *bootstrap*, baseado na matriz de distância genética calculado com o modelo HKY de sequências do gene *COI* de espécimes de *Potamotrygon* do alto rio Paraná.

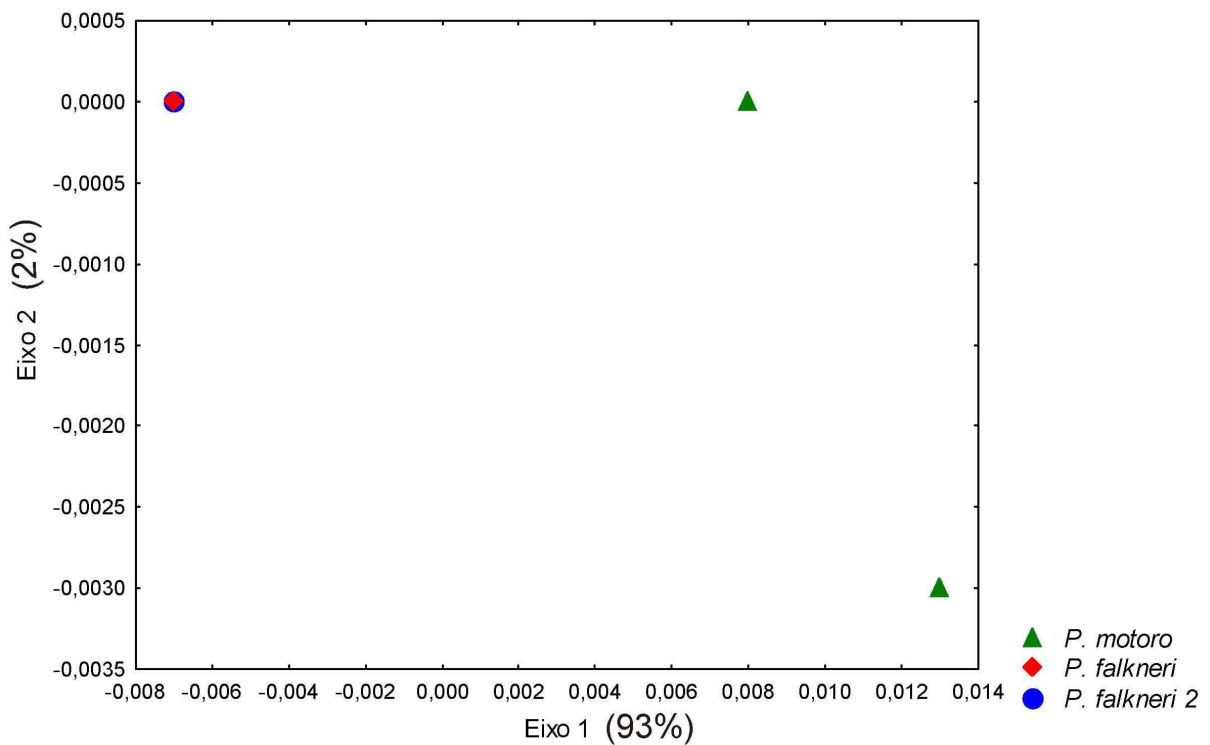


Figura 8: Gráfico de dispersão dos dois primeiros eixos da análise de coordenadas principais de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná, baseado nos autovetores calculados após correção de Lingoes a partir da matriz de distância genética HKY de sequências dos genes *COI*.

As médias das distâncias genéticas a partir das sequências de *COI* entre indivíduos de *P. motoro* e *P. falkneri* foi de 0,016 ou 1,6%. A análise de diversidade intra-específica a partir das sequências do *COI* de indivíduos de *P. motoro* e *P. falkneri* demonstrou os maiores valores de diversidade nucleotídica, haplotípica, distância “p” e número de haplótipos para grupo *P. motoro*. Todos os indivíduos de *P. falkneri* foram representados pelo mesmo haplótipo e apresentou valores de diversidade igual à zero (Tabela 5).

Tabela 5: Índices de Diversidade intra-específica obtidos a partir de sequências do gene *COI* de exemplares de *Potamotrygon* do alto rio Paraná. *N*= número de sequências; *h*= número de haplótipos; *Hd*= diversidade haplotípica; *Pi*= diversidade nucleotídica; “p”= distância genética não corrigida.

	<i>P. motoro</i>	<i>P. falkneri</i>
<i>N</i>	5	8
<i>h</i>	2	1
<i>Hd</i>	0,4	0,0
<i>Pi</i>	0,0017	0,0000
“p”	0,002	0,000

ATPase 8/6

Foram amplificados e sequenciados fragmentos parciais dos genes *ATPase 6* e *ATPase 8* de sete exemplares de *P. motoro* e nove de *P. falkneri* no alto rio Paraná. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 1.000 pares de bases (pb). Após o alinhamento, foram obtidos sequências de 402 pb. Essa sequência apresentou frequências nucleotídicas de A= 0,353; T= 0,267; C= 0,294 e G= 0,087 e taxa de transição/transversão de 2,2. A análise da escolha do modelo evolutivo que melhor explica as variações nas sequências dos genes parciais *ATPase 6* e *ATPase 8* indicou o modelo F81 como apropriado para explicar as variações nas sequências *ATPase 8/6*.

Os resultados obtidos no dendrograma *neighbor-joining* e no gráfico de dispersão demonstraram o agrupamento dos indivíduos em dois clados (Figs. 9 e 10). Nenhum exemplar dos grupos *P. falkneri 2* e *P. motoro x P. falkneri* foram utilizados nas análises das sequências de *ATPase 8/6*, devido problemas no seqüenciamento desses indivíduos. Foram observados três pontos de substituições nucleotídicas, sendo duas exclusivas para um dos dois grupos.

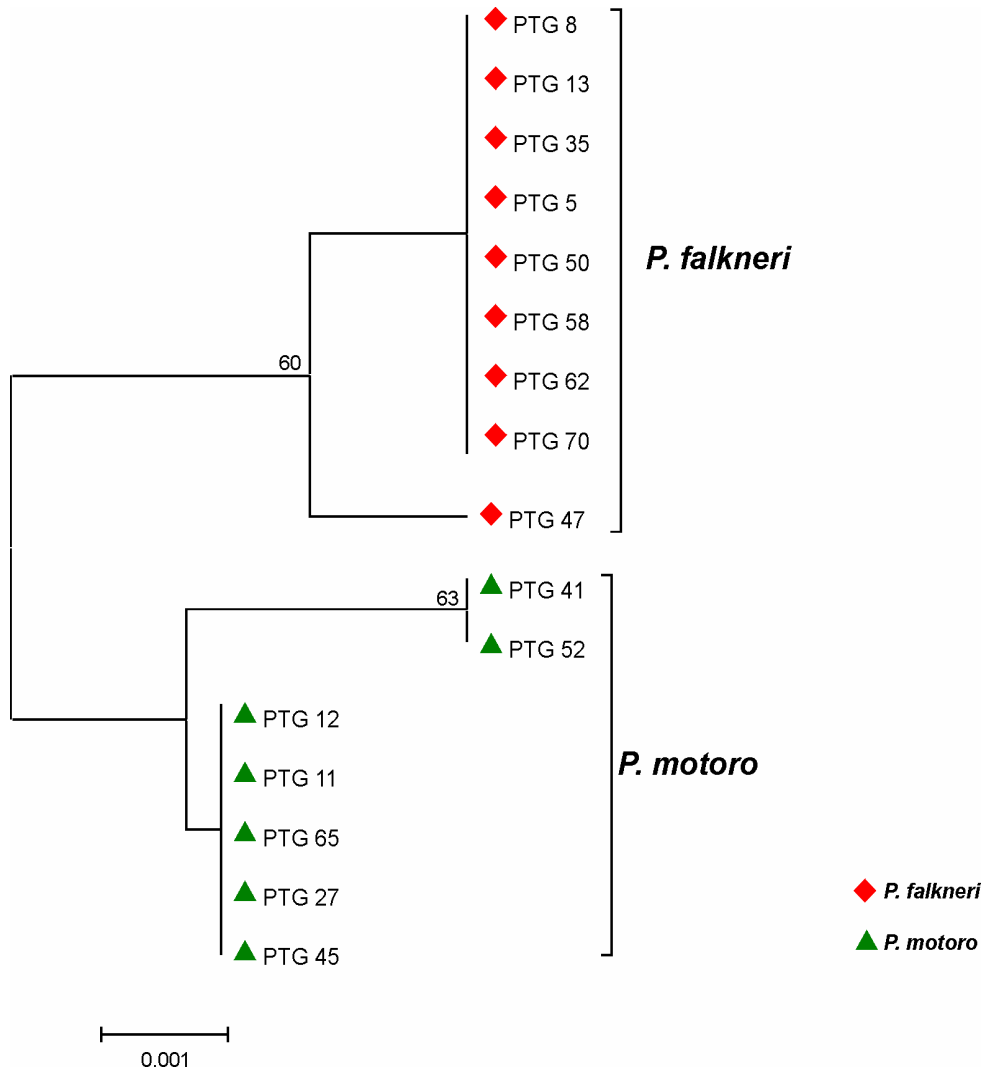


Figura 9: Dendrograma *neighbor-joining*, com 10.000 reamostragens *bootstrap*, baseado na matriz de distância genética calculado com o modelo F81 de sequências dos genes *ATPase 8/6* de espécimes de *Potamotrygon* do alto rio Paraná.

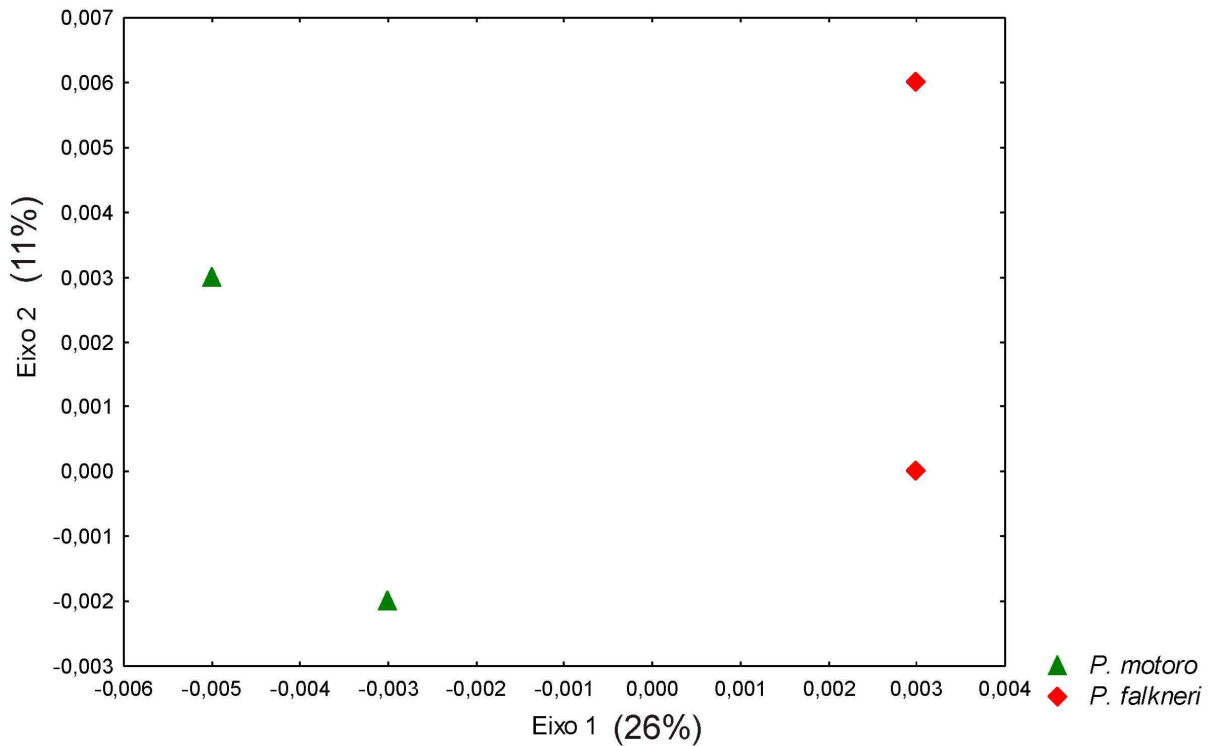


Figura 10: Gráfico de dispersão dos dois primeiros eixos da análise de coordenadas principais de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná, baseado nos autovetores calculados após correção de Lingoes a partir da matriz de distância genética F81 de sequências dos genes *ATPase 8/6*.

As médias das distâncias genéticas obtidas a partir das sequências de *ATPase 8/6* entre os indivíduos de *P. motoro* e *P. falkneri* foi de 0,006 ou 0,6%. A análise intra-específica a partir das sequências de *ATPase 8/6* de indivíduos de *P. motoro* e *P. falkneri* indicou que *P. motoro* apresentou os maiores valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, enquanto que os valores de distância “p” e número de haplótipos foram iguais para *P. motoro* e *P. falkneri* (Tabela 6).

Tabela 6: Índices de Diversidade intra-específica obtidos a partir de sequências do gene *ATPase* 8/6 de exemplares de *Potamotrygon* do alto rio Paraná. *N*= número de sequências; *h*= número de haplótipos; *Hd*= diversidade haplotípica; *Pi*= diversidade nucleotídica; “p”= distância genética não corrigida.

	<i>P. motoro</i>	<i>P. falkneri</i>
<i>N</i>	7	9
<i>h</i>	2	2
<i>Hd</i>	0,48	0,22
<i>Pi</i>	0,0012	0,0006
“p”	0,001	0,001

DNA nuclear

ISSR

Foram amplificados fragmentos ISSR de 15 indivíduos de *P. motoro* e 13 de *P. falkneri* no alto rio Paraná. Foram utilizados quatro *primers*, totalizando 21 locos ISSR analisados. Foram identificados oito locos monomórficos e 13 polimórficos, sendo sete espécie-específicos.

A figura 11, mostra o resultado da amplificação de fragmentos ISSR com o *primer* (CCTA)₄ para os exemplares de *P. motoro* e *P. falkneri* do alto rio Paraná. Na foto é possível observar locos monomórficos e polimórficos. As setas indicam locos exclusivos de uma das duas espécies e que podem ser utilizados para identificá-las.

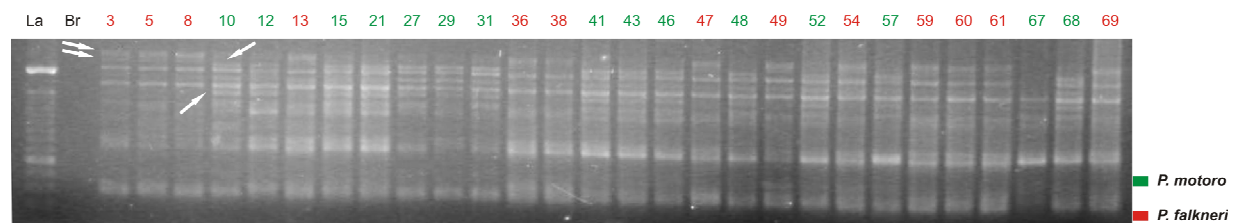


Figura 11: Gel de agarose 1,5% com resultado da reação de ISSR com o *primer* (CCTA)₄. 1ª coluna- Ladder 100 pb (La); 2ª coluna- Controle negativo (Br); demais colunas- indivíduos de *P. motoro* e *P. falkneri* do alto rio Paraná. Setas indicam bandas diagnósticas espécie-específica.

O dendrograma *neighbor-joining* e o gráfico de dispersão agruparam os indivíduos em dois clados, *P. motoro* e *P. falkneri* (Figs. 12 e 13). Os indivíduos identificados como híbridos *P. motoro* x *P. falkneri* nas análises do mtDNA, foram caracterizados, de acordo com os marcadores ISSR, como pertencentes ao grupo *P. motoro*.

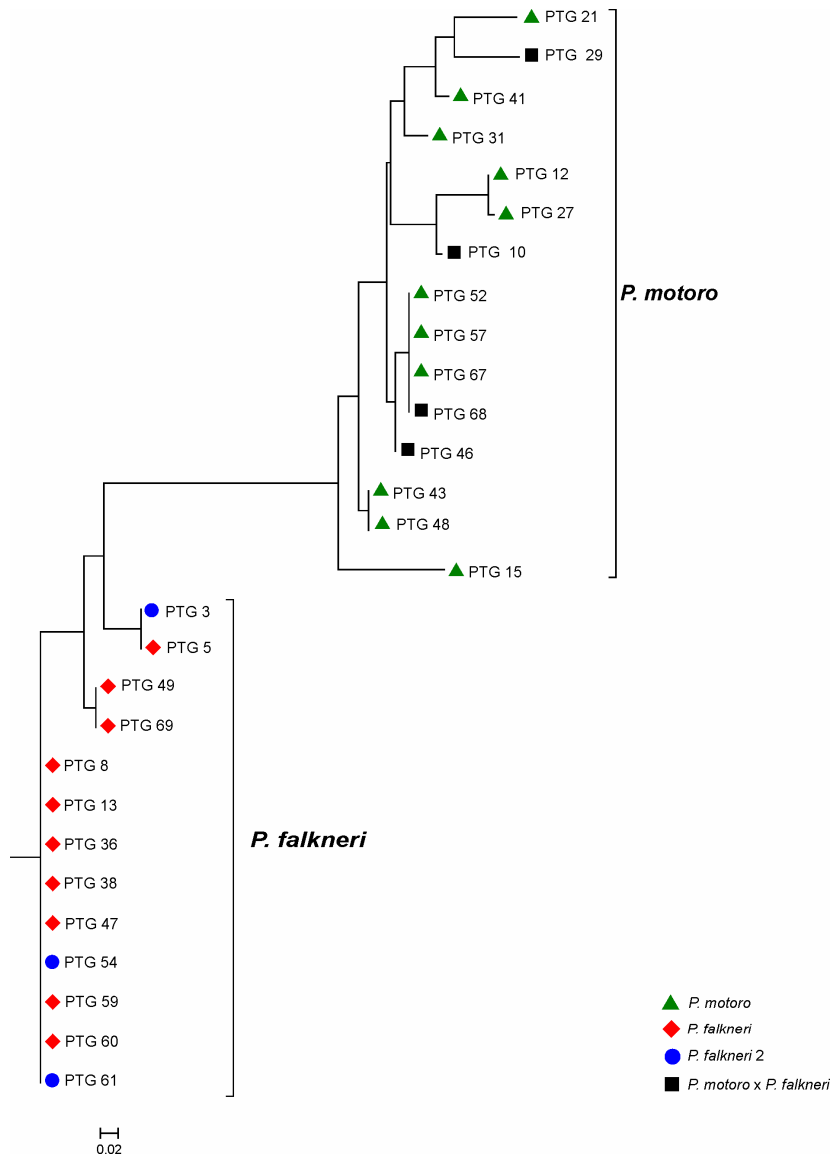


Figura 12: Dendrograma *neighbor-joining*, com 10.000 reamostragens de *bootstrap*, baseado nos complementos aritméticos dos coeficientes de similaridade de Jaccard, obtidos com marcadores *ISSR* para exemplares de *Potamotrygon* do alto rio Paraná.

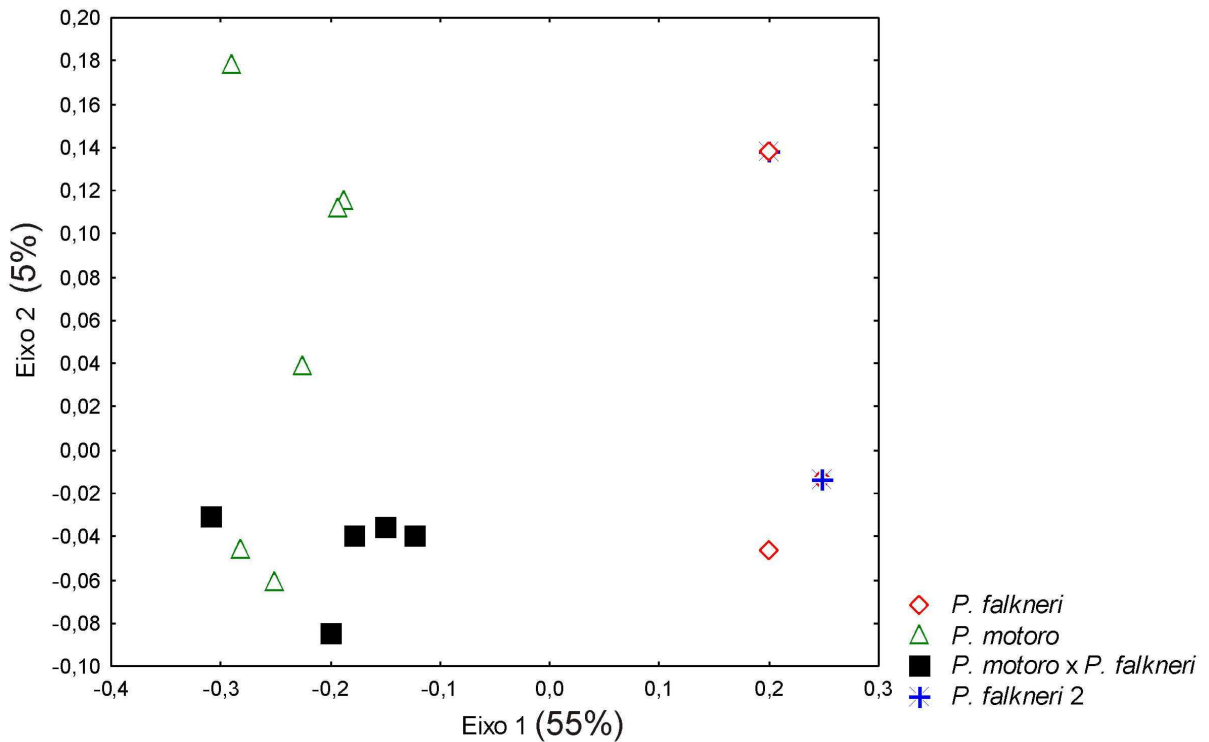


Figura 13: Gráfico de dispersão dos dois primeiros eixos da análise de coordenadas principais de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná, baseado nos autovetores calculados após correção de Lingoes a partir da matriz de distância genética de Jaccard de marcadores *ISSR*.

A distância genética calculada com os resultados do *ISSR* entre as espécies *P. motoro* e *P. falkneri* foi de 0,438 e o índice de fixação molecular F_{st} foi de 0,83661, indicando que 84% das diferenças foram encontradas entre indivíduos de espécies diferentes e apenas 16% entre indivíduos da mesma espécie. Os valores de distância genética, número de sítios polimórficos e número de haplótipos foram muito maiores para *P. motoro* do que para *P. falkneri* (Tabela 7).

Tabela 7: Índices de Diversidade intra-específica obtidos a partir de marcadores *ISSR* de exemplares de *Potamotrygon* do alto rio Paraná.

	Distância Genética de Jaccard	Sítios Polimórficos	Número de Haplótipos
<i>P. motoro</i>	0,116	4	11
<i>P. falkneri</i>	0,045	2	3

DISCUSSÃO

Avaliação da diferenciação genética

As análises do DNA mitocondrial e nuclear dos exemplares de *Potamotrygon* do alto rio Paraná foram eficientes na separação e caracterização das duas espécies de raias estudadas, *P. motoro* e *P. falkneri*. Todas as análises genéticas indicaram a separação das duas espécies, entretanto, os valores de diferenciação genética encontrados entre elas, com exceção dos resultados obtidos com o marcador *ISSR*, foram muito baixos com valores de distância “p” mínimo de 0,5% encontrado na análise do gene *Cyt b* entre *P. motoro* e *P. falkneri*, e máximo de 2% na análise do *D-Loop* entre *P. motoro* e *P. falkneri* 2, indicando a especiação recente dessas duas espécies. A relativa alta diferenciação genética encontrada no marcador *ISSR* entre *P. motoro* e *P. falkneri* no alto rio Paraná, representada por sete locus diagnóstico espécie-específicos e elevado valor de F_{st} (0,84), pode ser explicada pelo baixo número de *primers* utilizados e a escolha apenas de *primers* que apresentaram polimorfismo.

Os potamotrigonídeos sul-americanos tiveram origem marinha durante uma massiva invasão marinha nas águas doce da bacia amazônica, aproximadamente 15-23 milhões de anos atrás. Entretanto, a especiação de alguns potamotrigonídeos, como por exemplo, *P. motoro* e *P. castexi* das bacias do Orinoco e Amazônica, respectivamente, é muito mais recente, sendo estimada aproximadamente de três milhões de anos atrás (Lovejoy *et al.*, 1998).

A partir das sequências de *Cyt b* de *P. motoro* da bacia do rio Orinoco e *P. castexi* da bacia amazônica, apresentadas no trabalho de Lovejoy *et al.* (1998), foi possível calcular a distância “p” entre essas duas espécies. O valor de distância “p” de 3,4% foi aproximadamente sete vezes maior que a distância encontrada entre *P. motoro* e *P. falkneri* do alto rio Paraná (0,5%). Esse resultado confirma a hipótese de recente especiação dos potamotrigonídeos do alto Paraná. Se considerarmos a calibração feita por Lovejoy *et al.* (1998), podemos estimar que a diferenciação das espécies de raia do alto Paraná ocorreu muito mais recentemente, por volta de 500 mil anos atrás.

Estudos com *Cyt b* em raias marinhas também foram eficientes em demonstrar a diferenciação genética entre espécies crípticas. Smith *et al.* (2009) encontraram valores de diferenciação genética entre *Gymnura crebripunctata* e *Gymnura marmorata* no oceano pacífico muito mais altos do que os encontrados no presente estudo, com valor médio de distância genética de 0,345, indicando uma especiação por volta de 45 milhões de anos atrás.

Os valores de diferenciação genética encontrados nas análises das sequências *D-Loop* e *ATPase 8/6* também foram muito menores do que as encontradas em outro trabalho com raias de água doce sul-americanas. Frederico (2006) encontrou valores de distância “p” para sequências de

D-Loop entre populações amazônicas de *Paratrygon aiereba*, variando de 1,19% e 7,43%, valores acima dos encontrados entre *P. motoro* e *P. falkneri* neste trabalho (1,8 e 2%). Os valores de distância “p”, encontrados pela autora, para as sequências de *ATPase 8/6* foram de 1% para indivíduos de uma mesma população e de 4 a 6% para indivíduos de populações diferentes. Os valores dentro de uma mesma população de *P. aiereba* foram maiores do que os encontrados entre as espécies *P. motoro* e *P. falkneri* (0,6%) do alto rio Paraná.

Os valores de diferenciação genética calculados com as sequências *COI* para *P. motoro* e *P. falkneri* do alto rio Paraná foi 10 vezes maior do que a diversidade intra-específica (diversidade intra-específica igual a 0,15%, e diferenciação interespecífica de 1,6%), exatamente o valor limiar de diferenciação entre duas espécies, proposto pelo consórcio da Vida CBOL (Hebert *et al.*, 2004).

O valor de distância “p” entre *P. motoro* e *P. falkneri* do alto rio Paraná, calculados com as sequências *COI* (0,016), também pode ser considerado baixo quando comparado com os valores de diferenciação genética entre espécies de raias amazônicas, obtidos por Toffoli *et al.* (2008) que, analisando nove espécies de *Potamotrygon*, observaram valores intra-específicos de 0 a 0,02 e interespecíficos de 0,02 a 0,11.

Os resultados dos marcadores *D-Loop* e *Cyt b* indicaram a formação de dois grupos de *P. falkneri* no alto rio Paraná, com valores de diferenciação genética mais altos do que entre *P. motoro* e *P. falkneri*. Por outro lado, os marcadores *COI* e *ISSR* não mostraram essa diferenciação dos indivíduos de *P. falkneri* em dois grupos. Dessa forma, a consistência dos dois grupos de *P. falkneri* ainda não está bem estabelecida. Lonardoní (2009) também identificou dois grupos de *P. falkneri* com base em características ecomorfológicas na planície de inundação do alto rio Paraná. Apesar de haver indícios de formação de dois grupos geneticamente diferenciados, estudos posteriores, utilizando outros marcadores, são necessários para desvendar essa questão.

Avaliação da diversidade genética intra-específica

De modo geral, a diversidade intra-específica foi muito baixa para ambas as espécies de raia analisadas, com vários indivíduos compartilhando o mesmo haplótipo. A diversidade genética intra-específica foi maior em *P. motoro*, com exceção para os resultados obtidos com o *D-Loop*, que apresentou maior diversidade para *P. falkneri*. A maior diversidade morfológica observada nos indivíduos de *P. motoro* pode ser decorrente da maior diversidade genética encontrada. Foram coletados exemplares sem ocelos, com poucos ocelos, com muitos ocelos e ampla variação na coloração. Nas análises do *D-Loop* e *Cyt b* os indivíduos de *P. falkneri* foram divididos em *P. falkneri* 1 e *P. falkneri* 2, pois a diversidade entre os indivíduos desses grupos foi muito alta e provocaria distorção na análise da diversidade intra-específica de *P. falkneri*.

A baixa diversidade encontrada pode ser decorrente de vários fatores independentes ou em conjunto. As espécies de raia do alto rio Paraná, não são nativas dessa região, e não se conhece a diversidade genética das populações originais, podendo essas populações também apresentar baixa diversidade. Outro fator, é que se a população original apresentar alta diversidade, a nova população estabelecida provavelmente terá menor diversidade genética do que a população que a originou, pois pode ocorrer algum processo de deriva genética, efeito fundador e/ou gargalo de garrafa durante o processo de invasão (Sakai *et al.*, 2001). A dificuldade de adaptação dos colonizadores no novo habitat pode ter feito com que poucos exemplares de cada espécie conseguissem reproduzir e passar seus genes adiante, causando posteriormente a endogamia. Cruzamentos consanguíneos podem limitar o crescimento populacional e diminuir a probabilidade de persistência da população (Nieminen *et al.*, 2001), além da baixa variabilidade genética limitar a capacidade da população em evoluir (Sakai *et al.*, 2001).

Avaliação do processo de hibridação

Os indivíduos PTG10, PTG29, PTG46 e PTG68 foram preliminarmente identificados como *Potamotrygon motoro*, de acordo com as características morfológicas. Entretanto, as análises moleculares do mtDNA agruparam esses indivíduos junto com os exemplares de *P. falkneri*. Duas possibilidades foram levantadas; um simples problema de identificação, ou então, a produção de híbridos, com características morfológicas de *P. motoro* e mtDNA de *P. falkneri*. Assim, esses híbridos seriam provenientes do cruzamento entre um macho de *P. motoro* com uma fêmea de *P. falkneri*, já que a molécula de mtDNA tem herança materna.

Para esclarecer melhor essa situação, foi utilizado um marcador molecular nuclear, o ISSR. Por esse marcador ser nuclear, era de se esperar que os possíveis híbridos apresentassem locos específicos de *P. motoro* e locos específicos de *P. falkneri*. Curiosamente, o resultado do ISSR revelou que todos os híbridos apresentaram apenas locos específicos de *P. motoro*. Esse resultado excluiu o erro de identificação, pois, indubitavelmente esses exemplares apresentaram perfis eletroforéticos ISSR de *P. motoro*. Entretanto, esse resultado demonstrou haver não apenas um processo de hibridação entre as duas espécies de raias, mas sim um processo de hibridação-introgressiva, onde os híbridos estariam retrocruzando com os parentais, provocando um processo genético conhecido como introgressão gênica, que é a passagem de alelos de uma espécie para outra através do cruzamento de híbridos com os parentais.

No caso das raias do alto rio Paraná, o que provavelmente ocorreu foi, a princípio, a produção de híbridos férteis com mtDNA de *P. falkneri*. As fêmeas híbridas cruzaram com parentais *P. motoro* até o ponto em que praticamente todos os indivíduos descendentes desse

cruzamento possuíssem o DNA nuclear de *P. motoro* e o mtDNA de *P. falkneri*. Esse não seria o primeiro relato da possibilidade de produção de híbridos entre espécies de raias de água doce. Toffoli *et al.* (2008) observaram que indivíduos de *P. motoro*, *P. orbigny* e *P. scobina* compartilhavam os mesmos haplótipos. Uma das explicações do autor foi a possibilidade de hibridação.

A hibridação representa um sério mecanismo de extinção de espécies e ameaça à integridade de *pools* gênicos únicos (Morizot *et al.*, 1991; Scribner *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2002), além de poder originar linhagens mais adaptadas e vigorosas, com variantes mais agressivas (Arthington, 1991), causando distúrbios nas relações biológicas das comunidades.

Eventos de hibridação interespecífica podem ocorrer tanto em áreas nativas, quanto em locais onde ocorreram introduções, principalmente, quando a espécie introduzida possui compatibilidade genética com espécies locais ou com outras espécies introduzidas (Pierce & Van Den Avyle, 1997). Eventos de introduções são fatores contribuintes da hibridação em peixes (Scribner *et al.*, 2001). No alto rio Paraná, há relatos de hibridação em espécies de peixes introduzidas, como por exemplo, dos gêneros *Steindachnerina* (Oliveira *et al.*, 2002) e *Cichla* (Oliveira *et al.*, 2006).

No presente trabalho não foi possível avaliar se o processo de hibridação ocorreu após a introdução das espécies *P. motoro* e *P. falkneri* no alto rio Paraná, ou se esse processo ocorria abaixo de sete quedas, onde essas duas espécies já viviam em simpatria. A introdução, dessas espécies no alto rio Paraná ocorreu após o fechamento do reservatório de Itaipu, em 1982. Portanto, é provável que a hibridação entre *P. motoro* e *P. falkneri*, seja um processo anterior a sua introdução no alto rio Paraná, pois os híbridos estudados apresentaram locos ISSR apenas de *P. motoro*. Dessa forma, acredita-se que foram necessárias várias gerações de retrocruzamento com parentais *P. motoro* para que os híbridos perdessem os locos nucleares de *P. falkneri*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados no presente trabalho possibilitaram identificar e caracterizar geneticamente duas espécies de *Potamotrygon* no alto rio Paraná. *P. motoro* apresentou maior diversidade morfológica e genética e *P. falkneri* apresentou dois grupos bem diferenciados geneticamente. A diferenciação genética entre as duas espécies de potamotrigonídeos foi muito baixa, indicando que a especiação ocorreu recentemente, fato que pode ter propiciado a produção de indivíduos híbridos *P. motoro* x *P. falkneri*. Os híbridos apresentaram mtDNA de *P. falkneri* e DNA nuclear de *P. motoro*.

REFERÊNCIAS

- Agostinho, A. A., Júlio-Jr., H. F. & Borghetti, J. R. (1992). Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: Reservatório de Itaipu. *Revista UNIMAR* **14**, 89-107.
- Almeida, M. P., Barthem, R. B., Viana, A. S. & Charvet-Almeida, P. (2009). Factors affecting the distribution and abundance of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) at Marajó Island, mouth of the Amazon River. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* **4(1)**, 1-11.
- Araújo, M. L. G., Charvet-Almeida, P., Almeida, M. P. & Pereira, H. (2004). Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Cites Organic. Doc. AC20 info v. 8, p. 1–6. Disponível em www.cites.org/common/cttee/ac/20/E20-inf-08.pdf.
- Arthington, A. H. (1991). Ecological and genetic impacts of introduced and translocated freshwater fishes in Australia. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* **48(1)**, 33-43.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2nd Edition. Sinauer Associates Inc. 684p.
- Bermingham, E. & Martin, A. P. (1998). Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology* **7**, 499-517.
- Britski, H., Silimon, K. Z. S. & Lopes, B. S. (1999). *Peixes do pantanal: manual de identificação*. 1^a ed. Brasília, DF: Embrapa. 184p.
- Brown, W. M. (1983). Evolution of animal mitochondrial DNA. In *Evolution of Genes and Proteins* (Nei, M. & Koehn, R. K. eds.), pp. 62-88. Sunderland, MA. Sinauer.
- Cantatore, P., Roberti, M., Pesole, G., Ludovico, A., Milella, F., Gadaletta, M. N. & Saccone, C. (1994). Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *Journal of Molecular Biology* **39**, 589-597.
- Carvalho, M. R., Lovejoy, N. R. & Rosa, R. S. (2003). Family Potamotrygonidae (river stingrays). In *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America* (Reis, R. E.; Kullander, S. O. & Ferraris, Jr. C. J., eds.), pp. 22-28. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Castex, M. N. (1967). Notas sobre los dientes de las especies del género Potamotrygon Garman, 1877 (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Physis* **26(73)**. 493-496.

- Charvet-Almeida, P., Araújo, M. L. G., Rosa, R. S. & Rincón, G. (2002). Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. *Shark News* **14**, 47-51.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Faber, J. E. & Stepien, C. A. (1977). The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae. In *Molecular Systematics of Fishes* (Kocher T. D. & Stepien, C. A., eds.), pp. 129-143, New York, Academic Press.
- Fernandes-Matioli, F. M. C., Matioli, S. R. & Almeida-Toledo, L. F. (2000). Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. *Genetics and Molecular Biology* **23**(4), 803-807.
- Frederico, R. G. (2006). Filogeografia e Conservação de *Paratrygon aiereba* Dumeril (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na região Amazônica. Dissertação de Mestrado INPA/UFMA, Manaus-AM, Brazil.
- García, G., Wlasiuk, G. & Lessa E. P. (2000). High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **129**, 93–110.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **270**, 313-321.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology* **2**, 1657-1663.
- Irwin, D. M., Kocher, T. H. & Wilson, A. C. (1991). Evolution of the Cytochrome b gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution* **32**, 138–144.
- Júlio-Jr., H. F., Tos, C. D., Agostinho, A. A. & Pavanelli, C. S. (2009). A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology* **7**(4), 709-718.

- Kocher T. D. & White T. J. (1989). Evolutionary analysis via PCR. In *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (Erich, H. A. ed), pp. 137-147, New York, Stockton Press.
- Legendre, P. & Anderson, M. J. (1998). Program DistPCoA. Montreal: Département de sciences biologiques, Université de Montreal.
- Legendre, P. & Anderson, M. J. (1999). Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* **69**, 1–24.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-1452.
- Lonardoní, A. P. (2009). Ecomorfologia e variação morfológica intra-específica de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes-Potamotrygonidae) na planície alagável do alto rio Paraná, Brasil. Dissertação de Mestrado, PEA, UEM-PR, Brazil.
- Lovejoy, N. R., Bermingham, E., & Martin, A. P. (1998). Marine incursion into South America. *Nature* **396(3)**, 421-422.
- Machordon, A. & Doadrio, I. (2001). Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **268**, 1297-1306.
- Martin A. P, Naylor G. J. P & Palumbi S. R. (1992). Rate of mitochondrial DNA evolution is slow in sharks compared to mammals. *Nature* **357**, 153–155.
- Meyer, A., Kocher, T. D., Basasibwaki, P. & Wilson, A. C. (1990). Monophyletic origin of Lake Victorian cichlid fishes suggested by mitochondrial sequences. *Nature* **347**, 550–553.
- Meyer, A. (1994). DNA technology and phylogeny of fish. In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (Beaumont, A. R. ed.), pp. 219-249. London, Chapman & Hall.
- Monesi, N., Jacobs-Lorena, M & Paco-Larson, M. L. (1998). The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed in early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **107(8)**, 559-569,
- Moritz, C. & Cicero, C. (2004). DNA barcoding: Promises and pitfalls. *PLoS Biology* **2**, 1529-1534.
- Morizot, D. C., Calhoun, S. W., Clepper, L. L., Schmidt, M. E., Williamson, J. H. & Carmichael, G. J. (1991). Multispecies hybridization among native and introduced centrarchid basses in Central Texas. *Transactions of the American Fisheries Society* **120**, 283-289.

- Nieminen, M., Singer, M. C., Fortelius, W., Schops, K. & Hanski, I. (2001). Experimental confirmation that inbreeding depression increases extinction risk in butterfly populations. *The American Naturalist* **157**, 237–244.
- Oliveira, A. V., Prioli, S. M. A. P., Pavanelli, C. S., Júlio-Jr, H. F. & Panarari, R. S. (2002). Diversity and distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. *Genetica* **115**, 259–267.
- 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. (2006). Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interespecific hybridization. *Journal of Fish Biology* **69**, 260-277.
- Pavlicek, A.; Hrdá, S. & Flegr, J. (1999). FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and *bootstrap*/*jackknife* analyses of the tree robustness. Applied to the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* **45**, 97-99.
- Perry, W. L., Lodge, D. M., & Feder, J. L. (2002). Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: an overlooked threat to North American biodiversity. *Systems biology* **51(2)**, 255-275.
- Pierce, P. C. & Van Den Avyle, M. J. (1997). Hybridization between introduced spotted bass and smallmouth bass in reservoirs. *Transactions of the American Fisheries Society* **126**, 939–947.
- Perdices, A. & Doadrio, I. (2001). The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19(3)**, 468–478.
- 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. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* **25(4)**, 421-430.
- Posada, D. & Crandall, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution (v.3.6). *Bioinformatics* **14**, 817–818.
- Rosa, R. S. (1985). *A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)*. Tese de Doutorado, College of William and Mary, Williamsburg.

- Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A., Baughman, S., Cabin, R. J., Cohen, J. E., Ellstrand, N. C., McCauley, D. E., O'Neil, P., Parker, I. M., Thompson, J. N. & Weller, S. G. (2001). The population biology of invasive species. *Annual Review Ecology and Systematics* **32**, 305-332.
- Scribner, K. T., Page, K. S. & Bartron, M. L. (2001). Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 293–323.
- Silva, A. G. C. (2006). *Morfometria e ecologia de Potamotrygon motoro (Natterer in Mueller & Henle, 1841) e Potamotrygon falkneri Castex & Maciel, 1963 (Chondrichthyes:Potamotrygonidae) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil*. Dissertação de Mestrado, PEA, UEM-PR, Brazil.
- Smith, M. F. & Patton, J. L. (1993). The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* **50**, 149–177.
- Smith, W. D., Bizzarro, J. J., Richards, V. P., Nielsen, J., Márquez-Farías, F. & Shivji, M. S. (2009). Morphometric convergence and molecular divergence: the taxonomic status and evolutionary history of *Gymnura crebripunctata* and *Gymnura marmorata* in the eastern Pacific Ocean. *Journal of Fish Biology* **75**, 761–783.
- StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- Swofford, D. L. (2002). *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.333.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Thorson, T. B., Langhammer, J. K. & Oetinger, M. I. (1983). Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* e *P. motoro*. *Environmental Biology of Fishes*. **9(1)**, 3-24.

Toffoli, T. H., Araújo, M. L. G. & Almeida, M. P. (2008). A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology* **31(1)**, 324-336.

Wong, B. B. M., Keogh, J. S. & Jennions, M. D. (2004). Mate recognition in a freshwater fish: geographical distance, genetic differentiation, and variation in female preference for local over foreign males. *Journal of Evolution Biology* **17**, 701-708.

Capítulo II - Comparação genética baseada em sequências mitocondriais *Cyt b* e *COI* entre *Potamotrygon motoro* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) do alto rio Paraná, rio Orinoco e bacia Amazônica

RESUMO

As raias sul-americanas de água doce são elasmobrânquios que invadiram a bacia Amazônica durante as incursões marinhas do mioceno. A bacia Amazônica é a região com maior concentração de espécies de potamotrigonídeos do mundo. A bacia Paraná- Paraguai também apresenta varias espécies de raia, inclusive com espécies endêmicas. *Potamotrygon motoro* é encontrada em ambas as bacias. Diferenças morfológicas entre exemplares de diferentes localidades indicam a possibilidade de complexo de espécie em *P. motoro*. Através de marcadores moleculares mitocondriais *Cyt b* e *COI* foram comparados geneticamente indivíduos de *P. motoro* das bacias do alto rio Paraná, bacia do rio Orinoco e bacia Amazônica. As análises das sequências mitocondriais demonstraram a elevada diferenciação genética, incompatível com indivíduos de mesma espécie. Os resultados permitiram concluir que os indivíduos identificados como *P. motoro* no alto Paraná, rio Orinoco e bacia Amazônia, na realidade, pertencem a espécies diferentes. Sendo assim, *P. motoro* deve ser considerado um complexo de espécies, e sua distribuição geográfica restrita à bacia Paraná-Paraguai, localidade-tipo dessa espécie.

Palavras-chave: Raia, *Cyt b*, *COI*, diferenciação genética

Chapter II - Genetic comparison based on mitochondrial sequences *Cyt b* and *COI* between *Potamotrygon motoro* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) from the Upper Paraná River, Orinoco River and the Amazon basin

ABSTRAT

South American freshwater stingrays are elasmobranchs that invaded the Amazon basin during miocene marine incursions. The Amazon basin is the region with the greatest concentration of potamotrygonid species in the world. The Paraná- Paraguay basin also presents several species of freshwater stingrays. *Potamotrygon motoro* is found in both basins. Morphological differences between specimens from different locations indicate the possibility of species complex in *P. motoro*. Through mitochondrial molecular markers *Cyt b* and *COI*, we genetically compares individuals of *P. motoro* from the Upper Paraná River,

Orino River and Amazon basins. The analysis of the mitochondrial sequences showed a high genetic differentiation, incompatible to individuals from the same species. The results showed undoubtedly that individuals identified as *P. motoro* in the Upper Paraná River, Orinoco River and Amazon basins belongs, in fact, to different species. Thus, *P. motoro* should be considered a species complex, and its distribution restricted to the Paraná- Paraguay basin, type locality of this species.

Keywords: Freshwater stingrays, *Cyt b*, *COI*, genetic differentiation

INTRODUÇÃO

As raias neotropicais de água doce pertencem à família Potamotrygonidae. O Brasil é o país com maior concentração de espécies de raias de água doce do mundo (Rosa, 1985). Das vinte espécies de *Potamotrygon* relacionadas por Rosa (1985), dezenove ocorrem em corpos hídricos brasileiros. A bacia Amazônica é a que contém o maior número de espécies válidas, com pelo menos 13 espécies (Araújo *et al.*, 2004), e pelo menos sete habitam a bacia Paraná- Paraguai (Garrone-Neto *et al.*, 2007). A maioria das espécies apresenta distribuição restrita a uma bacia, com apenas algumas espécies presentes em mais de uma bacia, como por exemplo, *P. motoro*. Essas espécies podem requerer uma subdivisão depois de estudos adicionais (Carvalho *et al.*, 2003).

A maioria dos potamotrigonídeos apresenta arranjos dorsais coloridos, incluindo-se pontos de várias dimensões, ocelos, marcas vermiformes e padrões de reticulado, que são geralmente espécie-específicos (Carvalho *et al.*, 2003). A existência de policromatismo que ocorre neste grupo muitas vezes resulta em identificações errôneas.

A espécie *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841), descrita do rio Cuiabá, bacia do Paraguai, Brasil (Carvalho *et al.*, 2003), apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco e do Prata (Araújo *et al.*, 2004). Por algumas dessas bacias estarem geograficamente isoladas por longo período, é possível que as populações encontradas fora da localidade- tipo e identificadas como *P. motoro*, pertençam a outras espécies.

Evidências de inconsistência taxonômica de diversas formas foram relatadas para *P. motoro*. Foi observado um elevado grau de policromatismo no rio Negro (Araújo, 1998), e no rio Amazonas (Charvet-Almeida, 2004). Silva (2006) identificou dois grupos ecomorfológicos no alto rio Paraná, Toffoli *et al.* (2008) encontraram dois grupos geneticamente distintos na bacia amazônica e Garrone Neto *et al.* (2007) indicaram dificuldades na identificação de raias do alto rio Paraná devido a diferenças morfológicas associadas a grande variação na coloração.

Marcadores moleculares baseados em DNA constituem ferramentas auxiliares na identificação de espécies crípticas (Avise, 2004). O entendimento das substituições nucleotídicas no DNA tem papel central na biologia evolutiva e genética de populações (Martin & Palumbi, 1993). Em estudos de especiação e diferenciação entre populações, análises de sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) são um excelente ponto de partida (Avise, 2004).

O gene mitocondrial *Cyt b* é amplamente utilizado como “relógio molecular”, para estimar a diferenciação genética entre espécies (Kocher & White, 1989; Meyer *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1992; Cantatore *et al.* 1994; García *et al.*, 2000; Avise, 2004). E o gene *COI* vem sendo

utilizado na taxonomia molecular para caracterizar e identificar a biodiversidade do planeta (Herbert, *et al.*, 2003; 2004).

Devido à possibilidade de existência de complexo de espécie em *P. motoro*, o objetivo desse trabalho foi comparar geneticamente, através de dois marcadores moleculares mitocondriais *Cyt b* e *COI*, populações de *P. motoro* do alto rio Paraná com populações Amazônicas.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de exemplares de *Potamotrygon* no alto rio Paraná foram realizadas na planície de inundação do alto rio Paraná, próximo à cidade de Porto Rico – PR, nos anos de 2007 e 2008. Foram coletados 16 exemplares de *P. motoro*, quatro híbridos *P. motoro* x *P. falkneri* e 14 indivíduos de *P. falkneri* no alto rio Paraná. Além dois indivíduos coletados, foram utilizados de três sequências de *COI* de *P. falkneri* do alto rio Paraná (EF532679 - EF532681) do trabalho de Toffoli *et al.* (2008), disponíveis no GenBank.

Para comparação com potamotrigonídeos das bacias do Orinoco e Amazônica, foi utilizada uma sequência de *Cyt b* de *P. motoro* (AF110626) do rio Orinoco do trabalho de Lovejoy *et al.* (1998), e 15 sequências da bacia Amazônica, sendo uma de *Cyt b* de *P. castexi* do rio Manu (Peru) (AF110627), do trabalho de Lovejoy *et al.* (1998), 10 sequências de *COI* de *P. motoro* (EF532653, EF532655 - EF532662 e EF532664), do lago Janauacá e dos rios Juruá, Demini, Itu, Aripuanã e Parguaza (Venezuela) e quatro sequências de *COI* de *P. cf. motoro* (EF532669 - EF532672) do rio Tapajós do trabalho de Toffoli *et al.* (2008), disponíveis no GenBank.

De cada indivíduo foi retirado uma amostra de músculo da região lateral do corpo. As amostras foram preservadas em frascos com álcool comercial puro e armazenadas em freezer – 20°C. Após a retirada de músculo para a extração do DNA, a maioria dos exemplares foram fixados em formol e depositados na coleção ictiológica do NUPÉLIA.

Extração de DNA

O DNA total foi extraído baseado no método fenol-clorofórmio (Monesi *et al.* 1998), com modificações. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%), tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Espermidina 0,15 mM) e proteinase K (20 µg/µL) por 2 horas em banho-maria a 37°C.

Posteriormente o DNA foi purificado por extração com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio, respectivamente e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado. O tubo foi suavemente invertido para precipitar o DNA, a suspensão foi centrifugada por

10 min a 13.000 rpm e descartado o sobrenadante. O pellet foi lavado com etanol 70% gelado e centrifugado por 2 min. Depois de seco, o DNA foi ressuspense em 50 μ L de tampão TE diluído 10 vezes (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM). A suspensão de DNA foi armazenada a -20°C . Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para quantificação do DNA, por comparação com uma amostra conhecida de DNA λ de concentrações de 25, 50 e 100 ng, em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (20 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$).

Amplificações do DNA mitocondrial (mtDNA)

Os genes mitocondriais citocromo b (*Cyt b*) e citocromo c oxidase I (*COI*) foram amplificados via PCR. As amplificações foram realizadas a partir de amostras de DNA total, de acordo com Prioli *et al.* (2002). A mistura de reação de amplificação consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl_2 1,5 mM, 2,5 μM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U/Reação de *Taq* DNA polimerase, DNA genômico 30 ng e água deionizada e autoclavada para completar 25 μL . A obtenção dos fragmentos de interesse foi realizada em um ciclo inicial de 4 min a 94°C , 30 s a 50°C e 1 min 30 s a 72°C , seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C , 30 s a 56°C e 1 min 30 s a 72°C , e um último ciclo de 1 min a 94°C , 1 min a 56°C e 7 min a 72°C .

Cerca de 100 ng de DNA do produto final de cada reação de PCR foram usados diretamente como molde para sequenciamento em plataforma MegaBace (Amersham[®]), seguindo instruções do fabricante. As sequências nucleotídicas, sob o formato de cromatograma, foram editadas no programa BIOEDIT (Hall, 1999) e alinhadas com o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Utilizando-se os procedimentos Akaike Information Criterion corrigido (AICc) e Bayesian Information Criterion (BIC) do programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998), foi determinado, por máxima verossimilhança, o modelo mais ajustado aos dados. A diferenciação entre as espécies foi inferida de dendrogramas *neighbor-joining* e máxima-verossimilhança, construídos com o programa Paup 4.0b4 (Swofford, 2002), dendrograma bayesiano, construído com o programa Mr. Bayes 3.0 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), do gráfico de dispersão dos haplótipos em coordenadas principais, com o programa Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., 2005), após correção de Lingoies (Legendre & Anderson, 1999) e da tabela de distância genética não corrigida “p”, construída com o programa Mega 4.0.1 (Tamura *et al.*, 2007).

RESULTADOS

Citocromo b (*Cyt b*):

Foram amplificados e sequenciados o gene *Cyt b* de 27 exemplares de raia do alto rio Paraná. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb).

Após o alinhamento, foram obtidas sequências de 638 pb. Essa região apresentou frequências nucleotídicas de A= 0,287; T= 0,283; C= 0,303 e G= 0,127 e taxa de transição/transversão de 11,951. A análise de escolha do modelo evolutivo determinou que o modelo HKY é o que melhor explica as variações nas sequências *Cyt b*.

Os resultados dos três dendrogramas, *neighbor-joining*, máxima verossimilhança e bayesiano e do gráfico de dispersão em coordenadas principais, construídos com sequências do gene mitocondrial *Cyt b* foram congruentes em separar as espécies em clados diferentes. As duas espécies de *Potamotrygon* do rio Paraná ficaram próximas. O indivíduo de *P. castexi* da bacia Amazônica ficou relativamente próximo ao grupo de *P. motoro* do rio Paraná. Entretanto, ficou bem evidenciado que o exemplar de *P. motoro* do rio Orinoco foi o mais distante (Figs. 1A e B, 2 e 3).

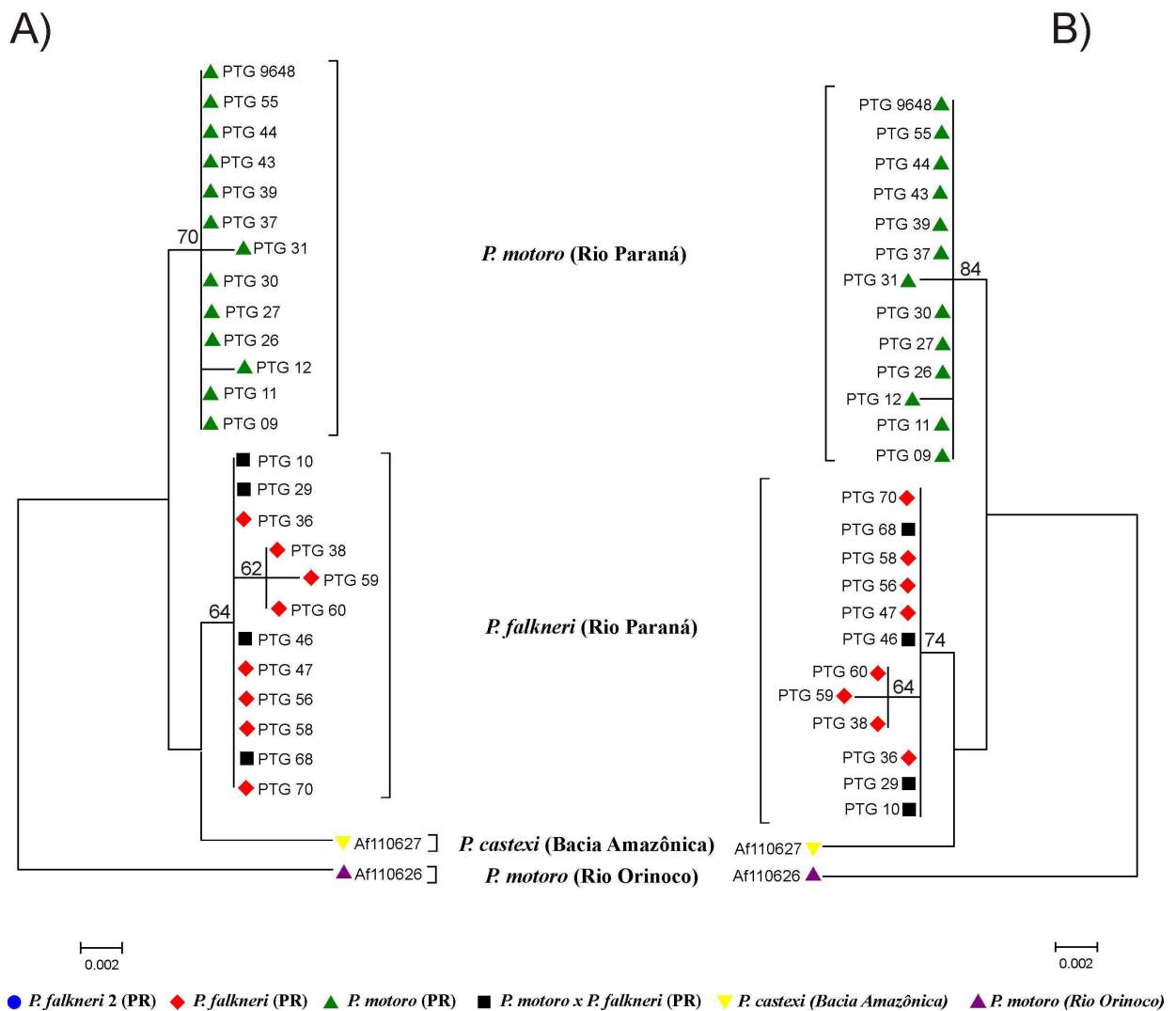


Figura 1: Dendrogramas máxima-verossimilhança com 5.000 reamostragens *bootstrap* (A) e *neighbor-joining* (B), com 10.000 reamostragens *bootstrap*, construídos de sequências do gene *Cyt b* de espécimes de *Potamotrygon* do alto rio Paraná, rio Orinoco e bacia Amazônica.

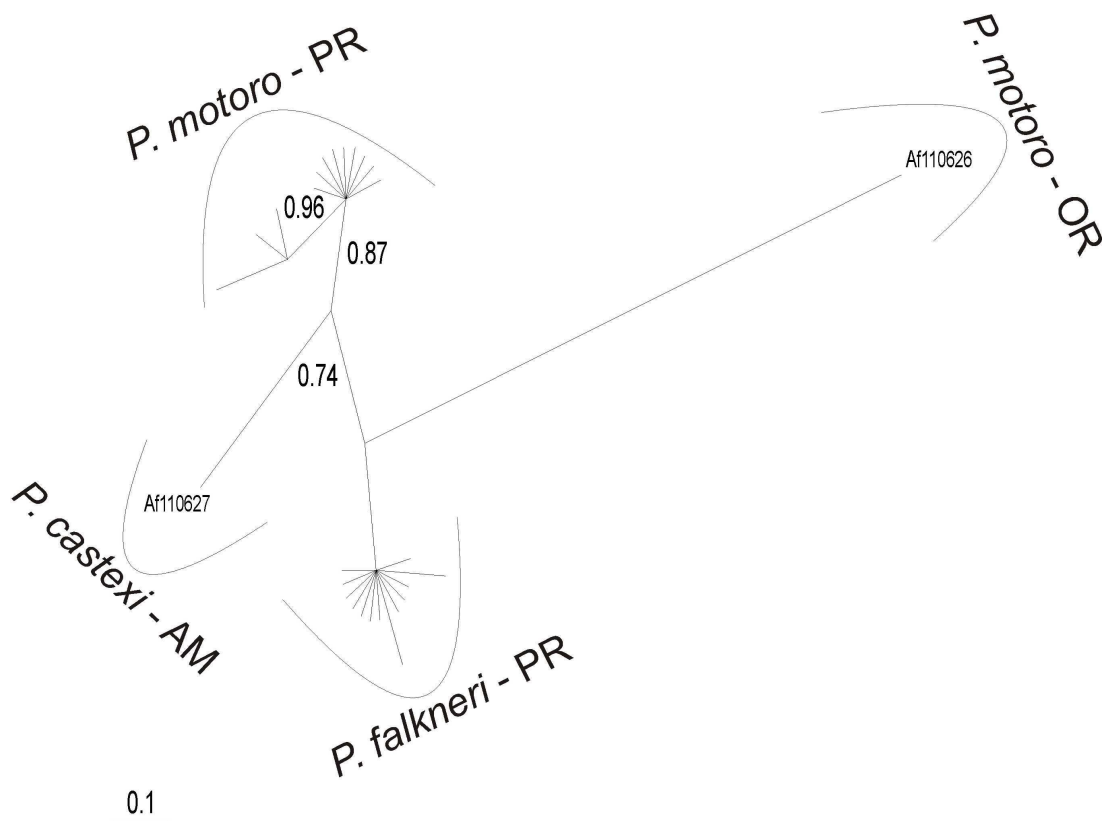


Figura 2: Árvore Bayesiana (Cadeias de Markov e Simulação de Monte Carlo –MCMC) construída com sequências do *Cyt b* de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná (PR), rio Orinoco (OR) e bacia Amazônica (AM). Os valores indicam as probabilidades *a posteriori* das relações genealógicas. As 20.000 gerações iniciais foram descartadas na geração da árvore.

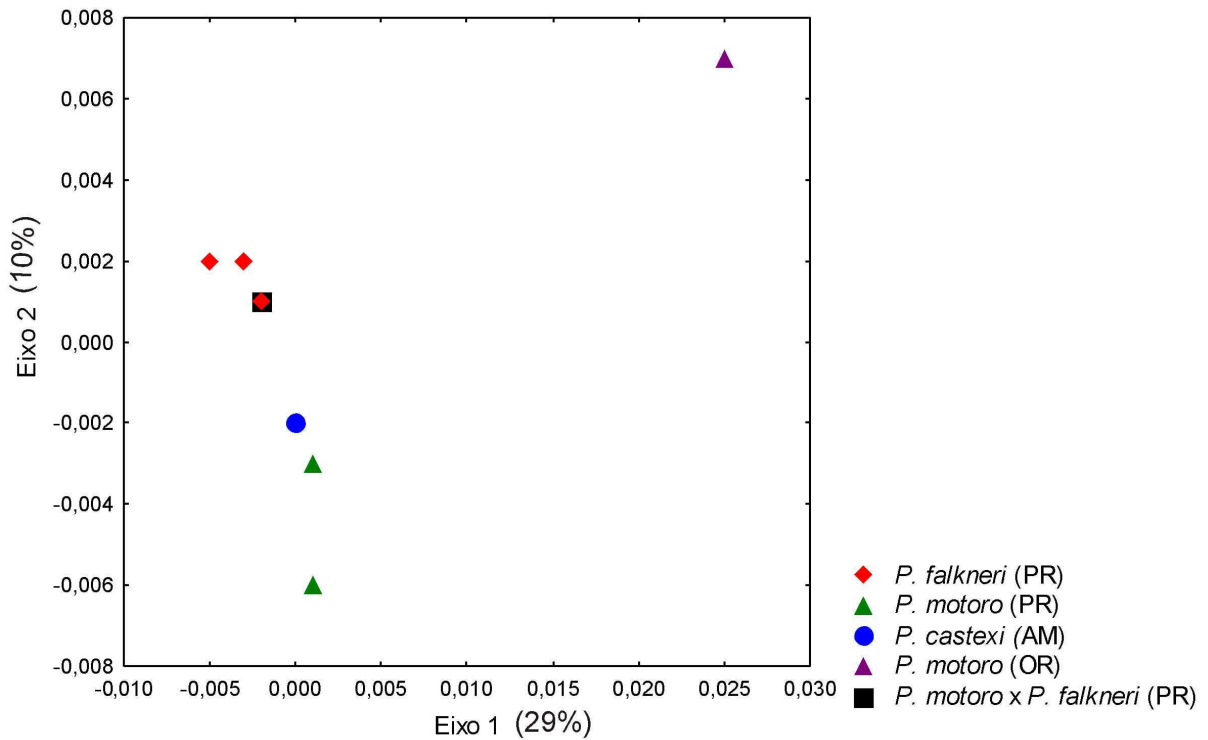


Figura 3: Gráfico de dispersão dos dois primeiros eixos da análise de coordenadas principais de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná, rio Orinoco e bacia Amazônica, baseado nos autovetores calculados após correção de Lingoes a partir da matriz de distância genética HKY de sequências dos genes *Cyt b*.

As médias da distância genética não corrigida “p”, obtidas das sequências do gene *Cyt b* entre indivíduos de espécies diferentes variaram de 0,5% a 2,7%. O menor valor foi encontrado entre indivíduos de *P. motoro* e *P. falkneri* do rio Paraná, e os maiores valores foram encontrados entre *P. motoro* do rio Orinoco com as demais espécies estudadas (Tabela 1).

Tabela 1: Média dos valores de distância genética não corrigida “p”, calculado a partir de sequências do gene *Cyt b* de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná (PR), rio Orinoco (OR) e bacia Amazônica (AM).

	<i>P. motoro</i> (PR)	<i>P. falkneri</i> (PR)	<i>P. castexi</i> (AM)
<i>P. falkneri</i> (PR)	0,005		
<i>P. castexi</i> (AM)	0,009	0,009	
<i>P. motoro</i> (OR)	0,024	0,026	0,027

Citocromo c Oxidase I (COI)

Foram amplificados e sequenciados o gene *COI* de 13 exemplares de raia do alto rio Paraná. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 800 pb. Após o alinhamento, foram obtidas sequências de 474 pb. Essa região apresentou frequências nucleotídicas de A= 0,28; T= 0,29; C= 0,259 e G= 0,172 e taxa de transição/transversão de 10,781. A análise da escolha do modelo evolutivo determinou que o modelo HKY é o que melhor explica as variações nas sequências *COI*.

Os resultados obtidos nos dendrogramas *neighbor-joining*, máxima verossimilhança e bayesiano e no gráfico de dispersão em coordenadas principais, construídos com sequências do gene mitocondrial *COI*, também mostraram a proximidade entre as espécies de raia do rio Paraná. Os indivíduos de *P. falkneri* do rio Paraná, analisados por Toffoli *et al.* (2008), ficaram agrupados junto com os indivíduos de *P. motoro* do rio Paraná. Os indivíduos de *P. motoro* e *P. cf. motoro* da Amazônia ficaram em agrupamentos bem distantes do agrupamento formado pelos indivíduos de *P. motoro* do rio Paraná. Um exemplar de *Plesiotrygon iwamae* foi utilizado como grupo externo.

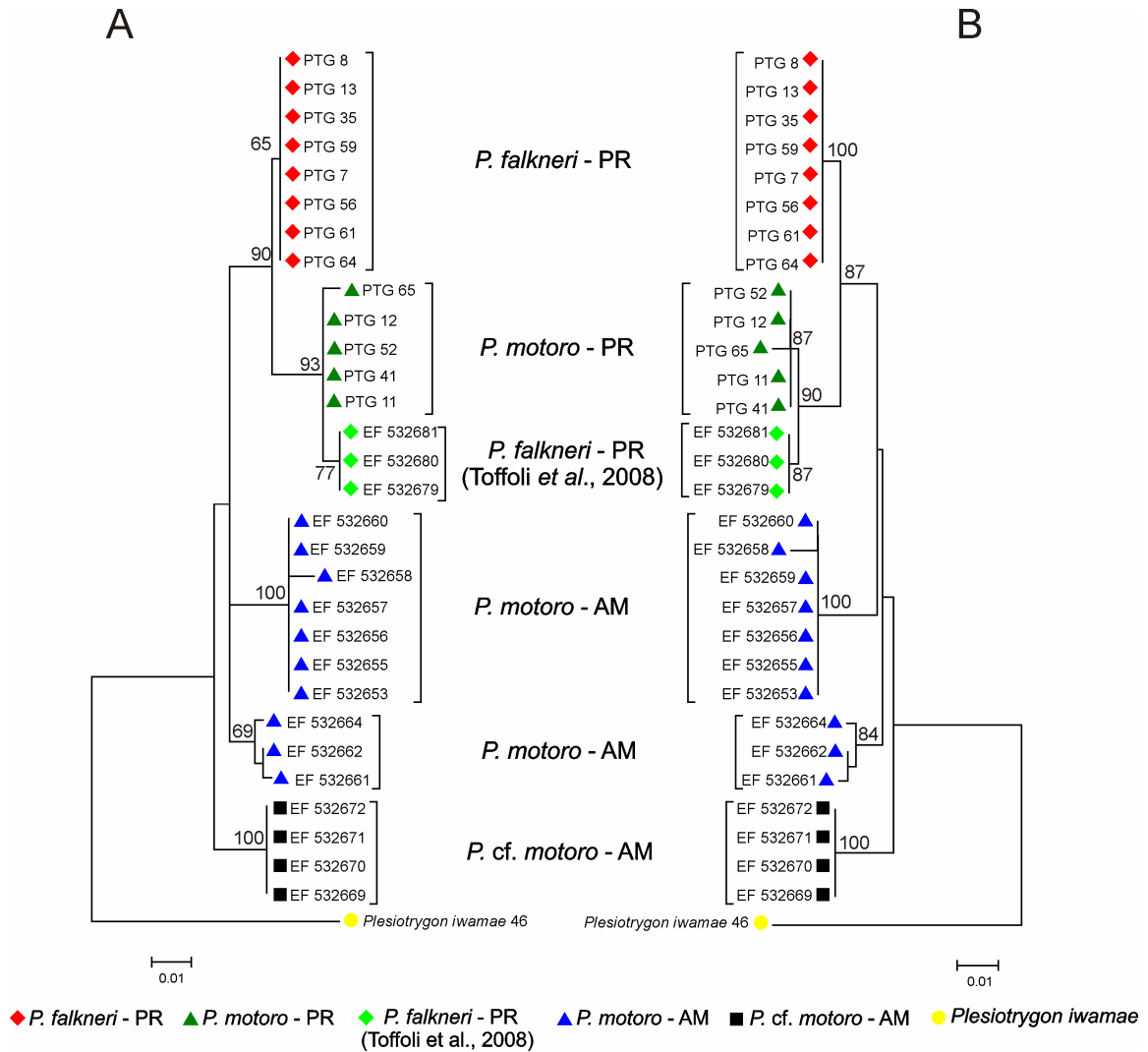


Figura 4: Dendrograma máxima-verossimilhança com 5.000 reamostragens *bootstrap* (A) e *neighbor-joining* (B), com 10.000 reamostragens *bootstrap*, construídos de sequências do gene *COI* de espécimes de *Potamotrygon* do alto rio Paraná e bacia Amazônica.

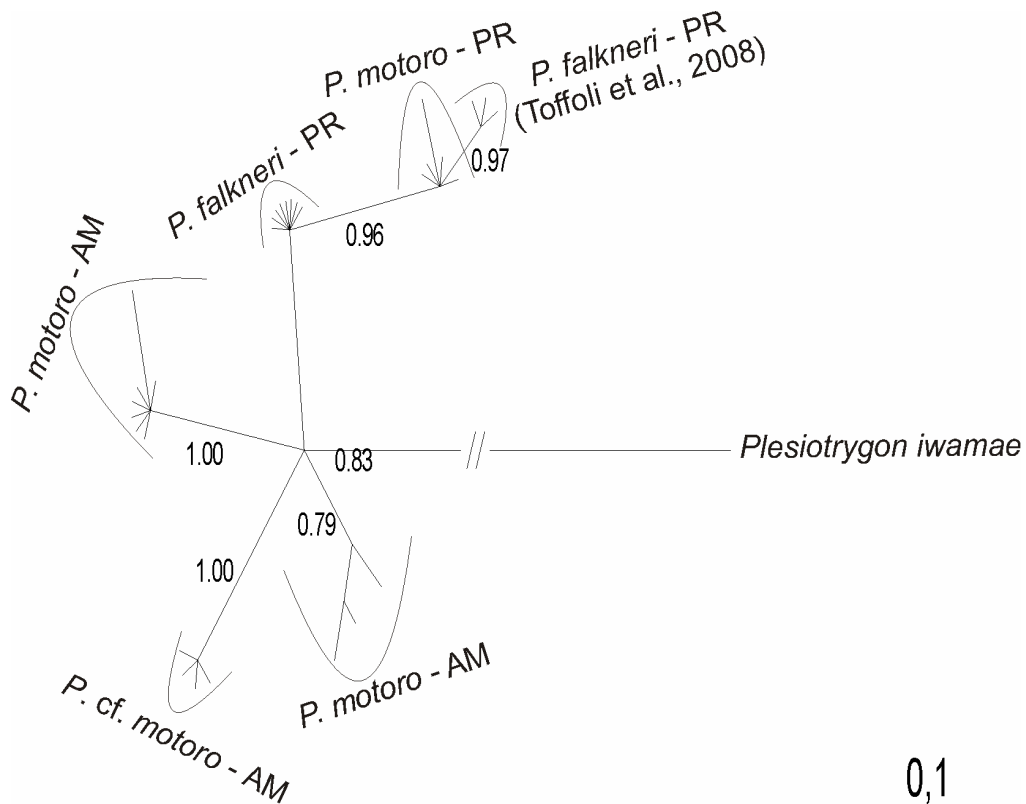


Figura 5: Árvore Bayesiana (Cadeias de Markov e Simulação de Monte Carlo –MCMC) construída com seqüências do *COI* de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná (PR) e da bacia Amazônica (AM). Os valores indicam as probabilidades a *posteriori* das relações genealógicas. As 20.000 gerações iniciais foram descartadas na geração da árvore.

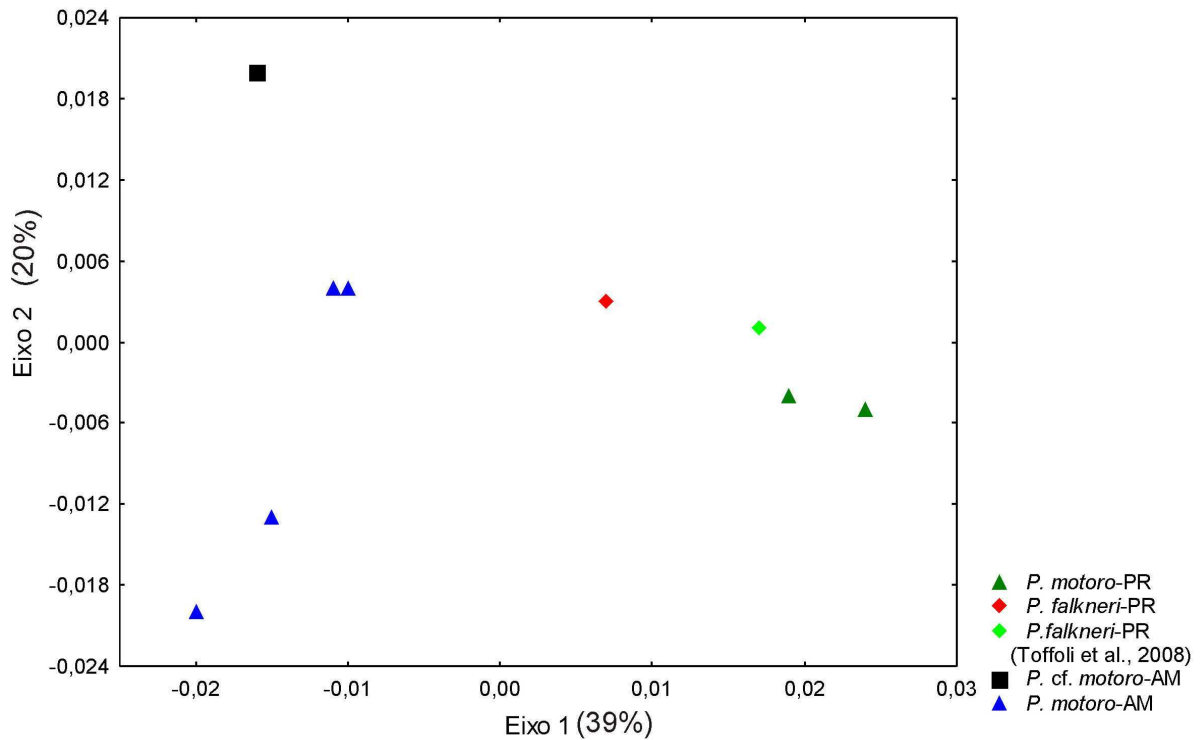


Figura 6: Gráfico de dispersão dos dois primeiros eixos da análise de coordenadas principais de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná e bacia Amazônica, baseado nos autovetores calculados após correção de Lingoes a partir da matriz de distância genética HKY de sequências dos genes *COI*.

As médias dos valores de distância genética não corrigida “p”, calculado a partir de sequências do gene *COI* de indivíduos de *Potamotrygon* variaram de 0,5% a 4,1%. O menor valor foi encontrado entre *P. motoro* do rio Paraná e *P. falkneri* do rio Paraná disponível por Toffoli *et al.* (2008). O maior valor foi encontrado entre *P. motoro* do rio Paraná e *P. cf. motoro* da Amazônia. É importante ressaltar que o valor entre *P. motoro* do rio Paraná e da bacia Amazônica foi o terceiro maior (3,5%) (Tabela 2).

Tabela 2: Média dos valores de distância genética não corrigida “p”, calculado a partir de seqüências do gene *COI* de indivíduos de *Potamotrygon* do alto rio Paraná e bacia Amazônica.

	<i>P. motoro</i> (PR)	<i>P. motoro</i> (AM)	<i>P. cf. motoro</i> (AM)	<i>P. falkneri</i> PR (Toffoli <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. motoro</i> (AM)	0,035			
<i>P. cf. motoro</i> (AM)	0,041	0,031		
<i>P. falkneri</i> (PR) (Toffoli <i>et al.</i> , 2008)	0,005	0,034	0,036	
<i>P. falkneri</i> (PR)	0,016	0,026	0,030	0,019

DISCUSSÃO

Os potamotrygonídeos ou raias de água doce são peixes cartilagosos que invadiram os rios amazônicos durante as incursões marinhas do mioceno (Lovejoy *et al.*, 1998). Dessa forma, a maioria das espécies é encontrada nessa bacia (Araújo *et al.*, 2004). Entretanto, houve um processo de dispersão dessas espécies e pelo menos sete habitam a bacia Paraná- Paraguai (Garrone-Neto *et al.*, 2007). *Potamotrygon motoro* apresenta ampla distribuição geográfica e está presente nas bacias dos rios Amazonas, Orinoco e do Prata (Araújo *et al.*, 2004). Espécies com ampla distribuição geográfica, presentes em mais de uma bacia hidrográfica, como por exemplo, *P. motoro*, podem tratar na verdade de um complexo de espécies (Carvalho *et al.*, 2003). Almeida *et al.* (2010) relatam haver uma alta diversidade alimentar em *P. motoro* de diferentes bacias hidrográficas. Esse fato pode ser decorrente justamente pela possibilidade de complexo de espécies em *P. motoro*.

Nas análises do gene *Cyt b*, o indivíduo de *P. motoro* do rio Orinoco apresentou os maiores valores de diferenciação genética quando comparado com todas as localidades estudadas (2,4 a 2,7%). Entretanto, a diferenciação genética entre as outras três espécies, *P. motoro* e *P. falkneri* do rio Paraná e *P. castexi* da bacia Amazônica, variou de 0,5 a 0,9%. O isolamento por distância geográfica não deve ser o fator preponderante para a alta diferenciação genética entre *P. motoro* do rio Paraná e da bacia do rio Orinoco (2,4%), pois a distância genética entre *P. motoro* do rio Paraná e *P. castexi* da bacia Amazônica foi relativamente baixa (0,9%).

Menezes (1972) relata a possibilidade de ter ocorrido, no passado, uma comunicação entre rios das bacias do Paraguai e Amazônica, inclusive, parte das espécies de peixes presentes na bacia do rio Paraguai seja proveniente da bacia Amazônica. Portanto, as espécies *P. motoro* e *P. falkneri* do rio Paraná e *P. castexi* da bacia Amazônica podem ter tido um ancestral comum, que

passou pelo processo de especiação mais recentemente, enquanto que *P. motoro* do Orinoco é originária de um ancestral mais antigo.

Da mesma forma, os resultados obtidos com o gene mitocondrial *COI* também mostraram o alto grau de diferenciação genética entre exemplares de *P. motoro* do rio Paraná e da bacia Amazônica. O valor de distância genética entre essas duas populações foi aproximadamente 12 vezes maior do que o valor de diversidade genética encontrado para a população do alto rio Paraná. De acordo com Hebert *et al.* (2004), que estimaram, para sequências *COI*, o valor limiar de diferenciação entre duas espécies, sendo 10 vezes maior do que a variabilidade intra-específica, as populações de *P. motoro* do alto Paraná e da Amazônia devem ser consideradas espécies diferentes.

Os indivíduos de *P. falkneri* apresentados por Toffoli *et al.* (2008) foram agrupados com os exemplares de *P. motoro* do alto rio Paraná. É possível que esses exemplares sejam decorrentes de processo de hibridação, onde os indivíduos apresentam morfologia de *P. falkneri* e mtDNA de *P. motoro*, ou pode ter ocorrido um problema de identificação nos indivíduos capturados pelo autor supramencionado, já que o número de exemplares foi reduzido e a correta identificação dos potamotrigonídeos do alto rio Paraná é dificultada pela ocorrência de policromatismo e hibridação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os genes mitocondriais *Cyt b* e *COI* foram eficientes na detecção do polimorfismo genético em espécimes de *Potamotrygon*. Todos os resultados obtidos foram condizentes em demonstrar a alta diferenciação genética entre indivíduos de *P. motoro* do alto rio Paraná e das bacias do Orinoco e Amazônica. Por conclusão, podemos afirmar que as populações identificadas como *Potamotrygon motoro* do alto rio Paraná e das bacias do Orinoco e Amazônica são de espécies diferentes. Portanto, *P. motoro* deve ser tratada como um complexo de espécies e este nome restrito aos exemplares da bacia Paraná- Paraguai. Dessa forma, estudos taxonômicos devem ser feitos a fim de definir se os indivíduos das bacias do Orinoco e Amazônica são de uma espécie ainda não descrita ou de outra espécie de *Potamotrygon* diferente de *P. motoro*.

REFERÊNCIAS

- Almeida, M. P., Lins, P. M. O., Charvet-Almeida, P., Barthem, R. B. (2010). Diet of the freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) on Marajó Island (Pará, Brazil). *Brazilian Journal of Biology* **70**(1), 155-162.
- Araújo M. L. G. (1998). Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp. C (Chondrichthyes, Potamotrygonidae), no médio rio Negro, Amazonas. Dissertação de Mestrado, UFAM/INPA, Manaus- AM, Brazil.
- Araújo, M. L. G.; Charvet-Almeida, P.; Almeida, M. P.; Pereira, H. (2004). Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Cites Organic. Doc. AC20 info v. 8, p. 1–6. Disponível em www.cites.org/common/cttee/ac/20/E20-inf-08.pdf.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2nd Edition. Sinauer Associates Inc. 684p.
- Cantatore, P., Roberti, M., Pesole, G., Ludovico, A., Milella, F., Gadaletta, M. N. & Saccone, C. (1994). Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *Journal of Molecular Biology* **39**, 589-597.
- Carvalho, M. R., Lovejoy, N. R. & Rosa, R. S. (2003). Family Potamotrygonidae (river stingrays). In *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America* (Reis, R. E.; Kullander, S. O. & Ferraris, Jr. C. J., eds.), pp. 22-28. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Charvet-Almeida, P. (2004). Sub-Estudo Elasmobrânquios. Relatório Técnico agosto de 2004. Estudo Estratégico n. 8, Bases Científicas para a Conservação da Várzea: Identificação e Caracterização de Zonas Biogeográficas. Pro Várzea/ IBAMA, Manaus.
- García, G., Wlasiuk, G. & Lessa, E. P. (2000). High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **129**, 93–110.
- Garrone-Neto, D., Haddad-Jr., V., Vilela, M. J. A. & Uieda, V. S. (2007). Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. *Biota Neotropica* **7**(1), 1-4.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **270**, 313-321.

- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology* **2**, 1657-1663.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754–755.
- Kocher T. D. & White T. J. (1989). Evolutionary analysis via PCR. In *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (Erich, H. A., ed), pp. 137-147, New York, Stockton Press.
- Legendre, P. & Anderson, M. J. (1999). Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* **69**, 1–24.
- Lovejoy, N. R., Bermingham, E., & Martin, A. P. (1998). Marine incursion into South America. *Nature* **396**(3), 421-422.
- Martin, A. P. & Palumbi, S. R. (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 4087-4091.
- Martin A. P, Naylor G. J. P. & Palumbi S. R. (1992). Rate of mitochondrial DNA evolution is slow in sharks compared to mammals. *Nature* **357**, 153–155.
- Menezes, N. A. (1972). 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: USP. Faculdade de Saúde Pública: Secretaria da Agricultura. Instituto de Pesca da C.P.R.N. 73-78.
- Meyer, A., Kocher, T. D., Basasibwaki, P. & Wilson, A. C. (1990). Monophyletic origin of Lake Victorian cichlid fishes suggested by mitochondrial sequences. *Nature* **347**, 550–553.
- Monesi, N., Jacobs-Lorena, M & Paco-Larson, M. L. (1998). The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed in early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **107**(8), 559-569.
- Posada, D. & Crandall, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution (v.3.6). *Bioinformatics* **14**, 817–818.
- 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. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the

- Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* **25(4)**, 421-430.
- Rosa, R. S. 1985. *A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)*. Tese de doutorado, College of William and Mary, Williamsburg.
- Silva, A. G. C. (2006). *Morfometria e ecologia de Potamotrygon motoro (Natterer in Mueller & Henle, 1841) e Potamotrygon falkneri Castex & Maciel, 1963 (Chondrichthyes:Potamotrygonidae) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil*. Dissertação de Mestrado, PEA, UEM-PR, Brazil.
- StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- Swofford, D. L. (2002). *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.333.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Toffoli, T. H., Araújo, M. L. G. & Almeida, M. P. (2008). A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology* **31(1)**, 324-336.