



Serviço Público Federal
Universidade Federal do Pará
Campus Universitário de Altamira
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

PPGBC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

Keila Xavier Magalhães

**DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Baryancistrus* RAPP PY-DANIEL, 1989
(SILURIFORMES: LORICARIIDAE) DO RIO XINGU E FILOGEOGRAFIA
DE *Baryancistrus xanthellus* RAPP PY-DANIEL, ZUANON E OLIVEIRA, 2011**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Melo de Sousa

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Janice Muriel
Fernandes Lima da Cunha

ALTAMIRA - PA

ABRIL - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS ALTAMIRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE DE CONSERVAÇÃO

Keila Xavier Magalhães

**DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Baryancistrus* RAPP PY-DANIEL, 1989
(SILURIFORMES: LORICARIIDAE) DO RIO XINGU E FILOGEOGRAFIA
DE *Baryancistrus xanthellus* RAPP PY-DANIEL, ZUANON E OLIVEIRA, 2011**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Melo de Sousa

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Janice Muriel
Fernandes Lima da Cunha

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

ALTAMIRA - PA

ABRIL - 2017

Keila Xavier Magalhães

**DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Baryancistrus* RAPP PY-DANIEL, 1989
(SILURIFORMES: LORICARIIDAE) DO RIO XINGU E FILOGEOGRAFIA
DE *Baryancistrus xanthellus* RAPP PY-DANIEL, ZUANON E OLIVEIRA, 2011**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Melo de Sousa

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Janice Muriel
Fernandes Lima da Cunha

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Aprovado em 07 de abril de 2017.

Banca Examinadora:

Dr. Cláudio de Oliveira (UNESP)
<http://lattes.cnpq.br/0297419882161114>

Dr. Ítalo Martins da Costa Mourthé (UFPA)
<http://lattes.cnpq.br/0147415006930129>

PhD. Lúcia Helena Rapp Py-Daniel (INPA)
<http://lattes.cnpq.br/2412972837389427>

Dr. Pedro Hollanda Carvalho (UFRJ)
<http://lattes.cnpq.br/9551567862449740>

ALTAMIRA - PA

ABRIL - 2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
UFPA – Campus de Altamira – Biblioteca

Magalhães, Keila Xavier

Delimitação de espécies de *Baryancistrus* Rapp Py - Daniel, 1989 (Siluriformes: Loricariidae) do rio Xingu e filogeografia de *Baryancistrus xantehellus* Rapp Py-Daniel, Zuanon e Oliveira, 2011/ Keila Xavier Magalhães: orientador, Prof. Dr. Leandro Melo de Sousa. - 2017.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Altamira, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Altamira, 2017.

1. Acari (Peixes). 2. Taxonomia. 3. DNA Mitocondrial. I.Titulo

CDD: 597.49

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento desde que citada a fonte - O autor”

Dedico este trabalho a meus amados pais, irmão e amigos que com muito apoio e carinho contribuíram para que mais esta etapa fosse concluída.

“Somos todos geniais. Mas se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em árvores, ele passará sua vida inteira acreditando ser estúpido”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará (UFPA) por meio do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBC) que permitiu o aperfeiçoamento dos meus conhecimentos em torno do vasto mundo da Biodiversidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa durante o período de mestrado.

A meu orientador Leandro Sousa, por ter aceitado mais uma vez a missão de me orientar, pelos conhecimentos compartilhados, pela atenção e incentivo, tornando possível a realização deste trabalho. Muito obrigada.

A minha coorientadora Janice Cunha pelo carinho e ter me recebido tão bem em Bragança e em seu laboratório, LABISA, e muito ajudou para a conclusão deste trabalho.

A professora Grazielle Gomes por ter me acolhido no Laboratório de Genética Aplicada (LAGA) e tê-lo cedido para a realização de todos procedimentos laboratoriais presentes neste trabalho, além de sua dedicação e carinho compartilhando comigo muitos dos seus conhecimentos. Muito obrigada.

A meu amigo Raimundo Silva (Everest) que com muita paciência compartilhou comigo todos os seus conhecimentos acerca das análises de genética populacional, tenho certeza que sem sua ajuda não teria sido possível a conclusão deste trabalho. Muito obrigada.

À Alany Gonçalves por toda a ajuda, amizade e ensinamentos, sendo sempre muito solícita, ajudando em todas as horas do desespero.

À Yrlene Ferreira pela amizade e por ter ajudado nos procedimentos laboratoriais.

Ao Renildo Oliveira e André Sawakuchi pela ajuda e considerações dadas ao trabalho.

À família do Laboratório de Ictiologia de Altamira (LIA), por ter me acolhido por todo esses anos e ter me proporcionado muitos aprendizados que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional além de todos os dias de alegria.

A meus queridos amigos Mateus Santana, Pedro Rocha e Felipe Gomes, pelo apoio, amizade e convívio diário, quero levá-los sempre comigo.

A minha amigas fitness Renata Lima e Dayanne Silva, a amizade de vocês foi

um grande presente que ganhei durante o mestrado, todo o apoio e carinho tornaram estes dias mais fáceis e felizes. Muito obrigada.

A minhas amigas do quinteto, Tarcyanny Zanelato, Magda de Freitas, Geiza Raposo, Maira Correia e aos meus amigos Carlos Augusto e André Martins por sempre estarem torcendo pelo meu sucesso.

Aos amigos que fiz em Bragança durante o período de análise laboratorial: Danillo Silva, Ivana Veneza, Leila Freitas, Kellyta Martins, Rafael Correa, Nana Sousa, Phillipe Figueiredo, João Netto, Brenda Gomes, Bárbara Branches e Keila Araújo.

A meu amigo Renan Leão por todo carinho, amizade e ter me dado abrigo durante todo o período que estive em Bragança.

Um agradecimento especial a meus pais, João Batista e Maria de Fátima, e irmãos Erivan Magalhães e Kerlen Magalhães, por todo carinho, dedicação e por sempre torcerem pelo meu sucesso. Nada seria possível se vocês não estivessem ao meu lado.

Agradeço a Deus que me deu forças para continuar mais essa caminhada com sabedoria e sempre nos momentos que pensei em desistir uma força maior me fazia seguir em frente

Muito obrigada a todos que torceram por mim e que de alguma forma contribuíram para que fosse possível a conclusão deste trabalho.

Sumário

ORGANIZAÇÃO GERAL	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	14
1. 1. Considerações Gerais	14
1. 2. O gênero <i>Baryancistrus</i>	16
1. 3. <i>Baryancistrus chrysolomus</i>	16
1. 4. <i>Baryancistrus xanthellus</i>	17
1. 5. <i>Baryancistrus</i> sp. “verde”	19
1. 6. <i>Baryancistrus</i> aff. <i>niveatus</i>	20
1. 7. Marcadores moleculares	20
1. 8. Justificativa	22
2. OBJETIVO GERAL	23
2. 1. Objetivos específicos	23
LITERATURA CITADA	23
Capítulo 02	28
Delimitação molecular das espécies de <i>Baryancistrus</i> Rapp Py-Daniel, 1989 (Siluriformes: Loricariidae) da bacia do rio Xingu	29
Resumo	30
1. Introdução	31
2. Material e Métodos	33
2. 1. Área de estudo e amostragem	33
2. 2. Procedimentos Laboratoriais	35
2. 2. 1. Isolamento do Material Genético e Regiões Genômicas	35
2. 2. 2. Sequenciamento	36
2. 2. 3. Banco de dados	36
2. 3. Análises populacionais	36
2. 4. Delimitação de espécies	37
3. Resultados	37
4. Discussão	42
Agradecimentos	45
Financiamento	45
Referências	45

Capítulo 03	52
Filogeografia de <i>Baryancistrus xanthellus</i> Rapp Py-Daniel, Zuanon e de Oliveira, 2011 (Siluriformes: Loricariidae), um peixe endêmico da bacia do rio Xingu	53
Resumo	54
Introdução	55
Material e Métodos	57
Área de estudo e amostragem	57
Procedimentos Laboratoriais	60
Isolamento do Material Genético e Regiões Genômicas	60
Sequenciamento	61
Preparação dos banco de dados	61
Análises Populacionais e Filogeográficas	62
Resultados	63
Caracterização dos Bancos e Níveis de Diversidade Genética	63
Estrutura genética populacional	65
Neutralidade e História Demográfica	72
Discussão	74
Diversidade Genética	74
Estrutura Populacional e Filogeografia	76
História Demográfica	78
Considerações Finais	80
Agradecimentos	81
Referências	81
Conclusão geral	86

ORGANIZAÇÃO GERAL

A presente dissertação encontra-se organizada em três capítulos. O primeiro deles corresponde ao capítulo integrador, descrevendo aspectos gerais da família Loricariidae dando ênfase ao gênero *Baryancistrus* e a espécie alvo do estudo, *Baryancistrus xanthellus*, além de abordar a importância dos estudos filogeográficos e o uso dos marcadores moleculares. Apresenta, dessa forma, a fundamentação teórica necessária para a compreensão das questões que serão abordadas nos capítulos seguintes, além dos objetivos do trabalho.

O capítulo II é apresentado sob forma de artigo científico, tratando sobre a delimitação das espécies do gênero *Baryancistrus* que ocorrem na bacia do rio Xingu, dando ênfase à suposta espécie nova para o grupo conhecida como *Baryancistrus* sp. “verde” e seu posicionamento no gênero.

O capítulo III também é apresentado no formato de artigo científico, no qual são abordados os padrões filogeográficos da espécie *B. xanthellus* ao longo de toda sua distribuição geográfica conhecida.

RESUMO

A diversidade de padrões de coloração em *Baryancistrus* varia de acordo com a sua localidade, fazendo com que uma mesma espécie apresente vários morfotipos reconhecidos com códigos-L no comércio de peixes ornamentais. *Baryancistrus xanthellus*, conhecida popularmente como acari-amarelinho possui grande importância no comércio de peixes ornamentais. Entretanto, ao longo de sua distribuição é possível observar diferentes padrões de pigmentação amarela em formato de pontos, distribuídos ao longo do corpo dos indivíduos, levantando suspeitas em relação à taxonomia da espécie. Apesar da importância comercial desta espécie, pouco se sabe sobre a genética de populações de *B. xanthellus*, devido à escassez de trabalhos. Os objetivos do presente estudo foram delimitar as espécies do gênero *Baryancistrus* que ocorrem na bacia do rio Xingu através da utilização de sequências de um fragmento do gene mitocondrial Citocromo b e utilizar marcadores mitocondriais e nucleares para realizar inferências sobre a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica da espécie *B. xanthellus*. Nossos resultados demonstraram a existência de sete Unidades Taxonômicas Operacionais Molecular (Molecular Operational Taxonomic Unit, MOTU) de *Baryancistrus* para esta bacia, sendo que a suposta espécie nova *Baryancistrus* sp. “verde”, na verdade, trata-se de uma variação de coloração da espécie conhecida como *B. xanthellus*, ressaltando a importância da taxonomia integrativa combinando informações baseadas em identificação morfológica com dados moleculares. Os resultados das análises populacionais revelaram a existência de cinco haplogrupos de *B. xanthellus* distribuídas ao longo do rio, padrão que pode estar relacionado a possíveis variações fisiográficas do rio Xingu resultantes de mudanças hidrológicas ocorridas na Amazônia durante o Quaternário tardio.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, Íntrons, MOTUs, Haplogrupos.

ABSTRACT

The diversity of coloring patterns in genus *Baryancistrus* varies obeying its location, doing that a same species exhibits several morphotypes recognized with L-codes in the Ornamental Fish Trade. *Baryancistrus xanthellus*, commonly known, as acari-amarelinho displays huge importance in the ornamental fish trade. However, throughout its distribution is possible to observe distinguished patterns of yellow pigmentation forming small dots distributed in the body of the individuals, raising up to several suspicions regarding of the taxonomy of this species. Despite of the commercial relevance, little is known about the genetics of populations of *B. xanthellus*, due to the lack of studies. The goals of the present study were identify species boundaries of genus *Baryancistrus* that occur in the Xingu river basin using DNA sequences from a fragment of Cytochrome b mitochondrial gene, and, through mitochondrial and nuclear markers perform some inferences about the genetic diversity, population structure and demographic history of *B. xanthellus*. Our results showed the existence of seven molecular operational taxonomy units (MOTUs) to genus *Baryancistrus* to this basin, being that a new candidate species *Baryancistrus* sp. “verde”, in fact, it is a color variation of the species known as *B. xanthellus*, emphasizing to the importance of an integrative taxonomy approach mixing morphological identification and molecular data. In addition, all population analysis reveleated the existence of five haplogroups of *B. xanthellus* distributed along of the river. This pattern found may be related to possible physiographic xingu River variations, resulting from hydrological changes in the Amazon forest during the late quaternary.

Keywords: Mitochondrial DNA, Intron, MOTUs, Haplogroups.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

Desde o Cenozóico, quando se deu início à diferenciação da fauna da região Amazônica, até os dias atuais, esta região vem passando por diversos processos evolutivos que fizeram com que ela possuísse a maior diversidade de espécies do mundo, tanto em ambientes terrestres quanto em aquáticos (HAFFER, 2008).

Quanto a hidrografia dessa região, o rio Xingu é considerado o quarto maior tributário da bacia Amazônica, possuindo 2.045 km de extensão e uma bacia hidrográfica que ocupa uma área de 520.292 km² (GOULDING et al., 2003). Este rio é caracterizado pela sua alta diversidade de ambientes, possuindo desde remansos a grandes corredeiras, características tais que fazem com que possua umas das maiores diversidades de peixes da região Amazônica, abrigando cerca de 480 espécies, sendo destas, 50 endêmicas para esta região (ZUANON, 1999; WINEMILLER et al., 2016).

Além disso, ele oferece um excelente cenário para estudos biogeográficos. Seus mais de 2000 km de extensão são permeados por inúmeras corredeiras de águas cristalinas correndo sobre formações rochosas do pré-cambriano no escudo do Brasil Central (ALMEIDA, 1978; GOULDING et al., 2003), propiciando isolamento geográfico e/ou ecológico com potenciais influências históricas sobre a diversidade de fenótipos e genótipos das populações de peixes ao longo desta região.

Dentro dos grupos de peixes que caracterizam a ictiofauna do rio Xingu, temos a ordem Siluriformes considerada a segunda maior ordem de peixes da região Neotropical. Os Siluriformes agregam cerca de 3.730 espécies distribuídas em 490 gêneros, que representam cerca de 10% do total da diversidade de peixes conhecida na região Amazônica (CRAMER et al., 2011; FERRARIS, 2007; NELSON et al., 2016). As espécies pertencentes a este grupo são conhecidas popularmente como bagres (*catfish*), por apresentarem o corpo sem escamas, podendo ser liso ou recoberto por placas, além da presença de até três pares de barbilhões ao redor da boca (BRITSKI et al., 1988; NELSON et al., 2016).

Os Siluriformes são constituídos por 40 famílias, com destaque para Loricariidae, que representa um dos grupos de peixes mais diversos da região Neotropical, sendo endêmico para a mesma, comportando aproximadamente 936 espécies válidas (ESCHMEYER e FONG, 2016) distribuídas em sete subfamílias: Lithogeninae, Neoplescostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostaminae, Ancistrinae e Delturinae (ARMBRUSTER, 2004; REIS et al., 2006; FERRARIS, 2007).

Os Loricariidae são conhecidos popularmente como cascudos ou acaris devido à presença de placas dérmicas que recobrem toda a sua parede corporal. Além disso, podem ser diferenciados das espécies de outras famílias por possuírem a região ventral achatada e uma boca inferior em forma de ventosa (REIS et al., 2003, NELSON et al., 2016) (Figura 1).

Os acaris ou cascudinhos são peixes que variam de porte pequeno a médio, com algumas espécies medindo até um metro de comprimento. Alimentam-se principalmente de algas e detritos, sendo classificados quase sempre como espécies detritívoras. Entretanto, à medida que mais estudos de dieta e comportamento são feitos, observa-se que várias espécies são, na realidade onívoras tendendo à carnivoria (larvas de insetos, moluscos e demais invertebrados bentônicos) (L. M. SOUSA, com. pess.). Podem ser capturados em todos os tipos de águas, desde ambientes lóticos, com alta correnteza, como as fortes corredeiras do rio Xingu, até grandes lagos (REIS et al., 2003; CRAMER, 2009; LUJAN et al., 2010).

Loricariidae é um grupo emblemático em relação à diversidade de espécies, além de exibirem distintos padrões de pigmentação corporal, na qual a mesma espécie pode apresentar uma dezena de variantes de acordo com sua área de ocorrência (CAMARGO e GHILARDI, 2009). Encontram-se amplamente distribuídos em toda a América do Sul, sendo encontrados desde o Uruguai e sul da Argentina até o norte da Costa Rica (REIS et al., 2003; CAMARGO et al., 2004).

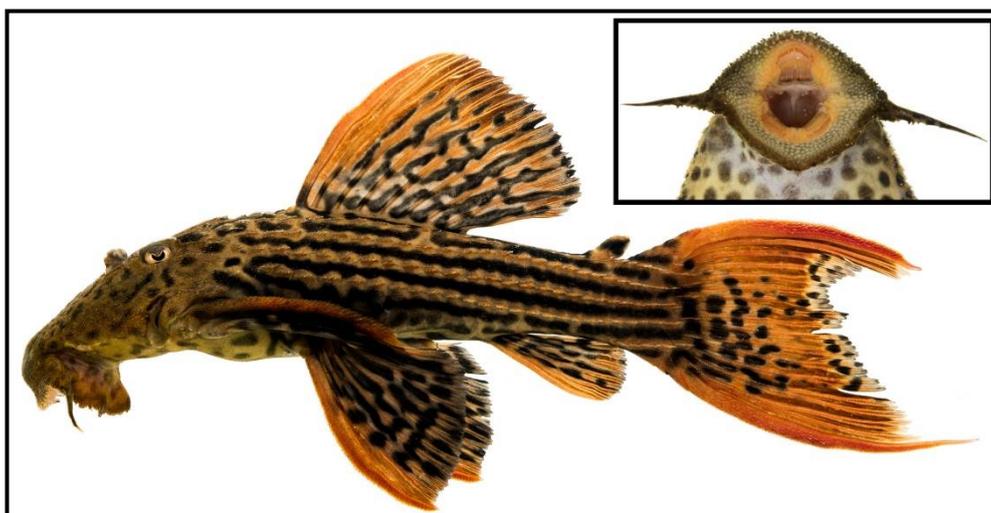


Figura 1. Foto de *Pseudacanthicus pirarara* (espécime vivo) destacando a morfologia externa básica de um exemplar típico da família Loricariidae. Em destaque, vista ventral da boca. (Foto de Leandro Sousa).

1.2. O gênero *Baryancistrus* Rapp Py-Daniel, 1989

A família Loricariidae atualmente é composta por 92 gêneros, sendo *Baryancistrus* representado por seis espécies: *Baryancistrus niveatus* (CASTELNAU 1855), *Baryancistrus chrysolomus* Rapp Py-Daniel, Zuanon e de Oliveira 2011, *Baryancistrus beggini* Lujan, Arcer e Armbrüster 2009, *Baryancistrus longipinnis* (KINDLE 1895), *Baryancistrus demantoides* Werneke, Sabaj, Lujan e Armbrüster 2005 e *Baryancistrus xanthellus* Rapp Py-Daniel, Zuanon e de Oliveira 2011.

As espécies de *Baryancistrus* podem ser diferenciadas dentre os demais gêneros de Loricariidae por uma combinação de caracteres, tais como: presença de uma membrana hipertrofiada posterior ao último raio da nadadeira dorsal alcançando a placa de sustentação da nadadeira adiposa, (exceto *B. beggini* a qual está totalmente conectada ao espinho da nadadeira adiposa); pré-maxilas paralelas ao focinho com grande número de dentes e abertura branquial relativamente curta quando comparada a *Parancistrus* (RAPP PY-DANIEL et al., 2011; WERNEKE et al., 2005).

Ainda estas espécies possuem um padrão de colorido muito atraente, o que faz com que elas sejam amplamente utilizadas no mercado de peixes ornamentais (CAMARGO e GHILARDI JR, 2009; RAPP PY-DANIEL et al., 2011; CAMARGO et al., 2013). Na bacia do rio Xingu, foram descritas duas espécies: *B. chrysolomus* e *B. xanthellus*, e ao menos duas possíveis novas espécies de *Baryancistrus* foram registradas para esta drenagem: *Baryancistrus* aff. *nivetaus* e *Baryancistrus* sp. "verde".

1.3. *Baryancistrus chrysolomus*

Baryancistrus chrysolomus é uma espécie endêmica da bacia do rio Xingu, conhecida popularmente como acari-aba-amarela. Esta espécie é diferenciada das demais do gênero, exceto de *B. xanthellus*, por possuir faixas amarelas nas extremidades das nadadeiras caudal e dorsal e um corpo escuro com pontos claros esmanecidos (Figura 2). Os indivíduos desta espécie habitam fendas rochosas em ambientes de correnteza lenta a moderada, onde há acúmulo de sedimentos. Alimentam-se principalmente de diatomáceas e larvas de insetos que estão associadas aos sedimentos (RAPP PY-DANIEL et al., 2011).

De acordo com Lujan et al. (2015), a classificação taxonômica de *Baryancistrus chrysolomus* é:

Ordem: Siluriformes

Família: Loricariidae

Subfamília: Hypostominae

Gênero: *Baryancistrus*

Espécie: *Baryancistrus chrysolomus*



Figura 2. Imagem da espécie *Baryancistrus chrysolomus* (Comprimento padrão=8,3 cm). (Foto: Leandro Melo de Sousa).

1.4. *Baryancistrus xanthellus*

Conhecida popularmente como acari-amarelinho ou cascudo-pepita-de-ouro, *B. xanthellus* (Figura 3) tem grande importância comercial, sendo muito apreciada na aquarioria, além de ser, em tamanho adulto, usada como fonte de alimentação pelos ribeirinhos e população da região da cidade de Altamira. É endêmica da bacia do rio Xingu e possui uma ampla distribuição dentro deste rio, podendo ser capturada desde a porção média do rio Xingu, em São Félix do Xingu até Belo Monte, no baixo curso da mesma bacia (RAPP PY-DANIEL et al., 2011; L. M. SOUSA, com. pess.).

Esta espécie é diferenciada de seus congêneres devido à presença de pontos amarelos que abrangem todo o seu corpo, e pela presença de faixas conspícuas na extremidade das nadadeiras caudal e dorsal. As faixas manchas nas nadadeiras estão presentes nos indivíduos juvenis dessa espécie e vão desaparecendo quando os mesmos se tornam adultos (RAPP PY-DANIEL et al., 2011).

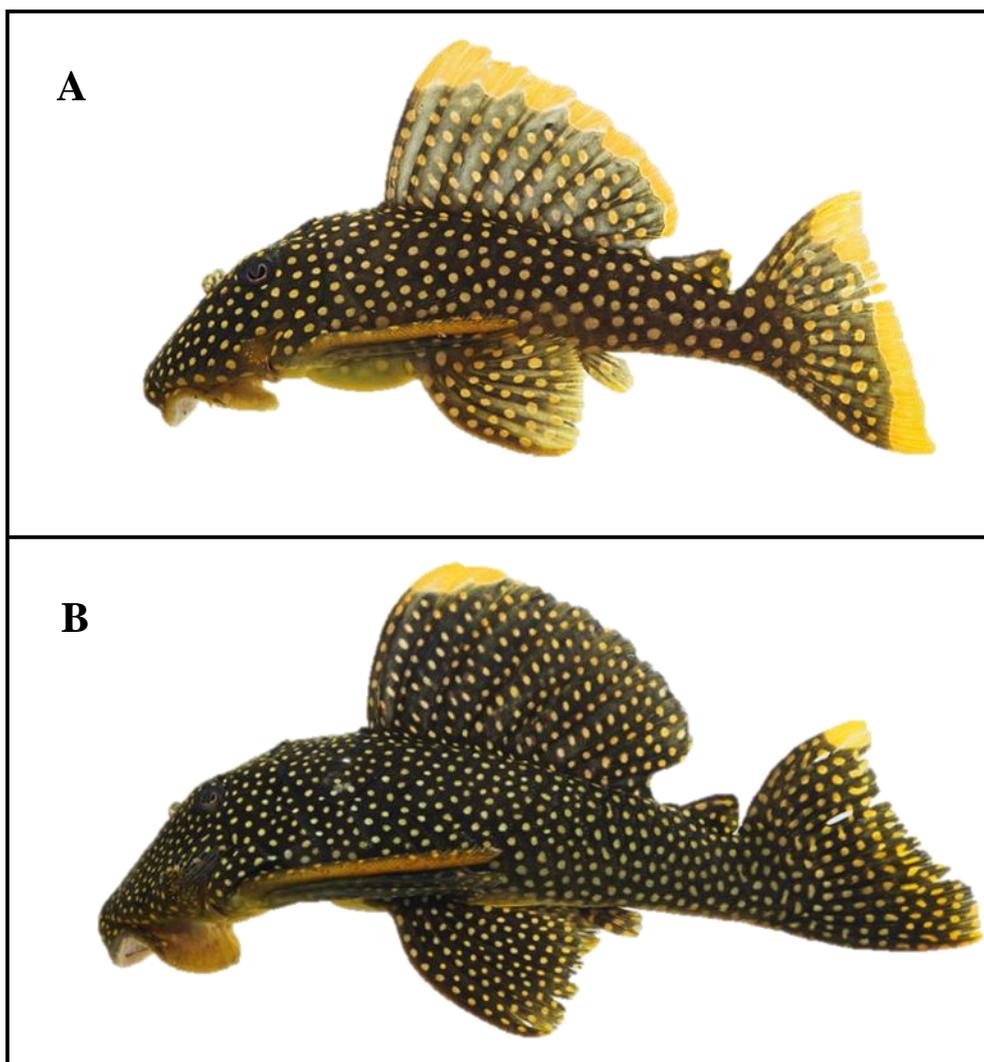


Figura 3. Imagens de indivíduos da espécie *Baryancistrus xanthellus*. **A.** Representante de um indivíduo jovem (CP=14,6 cm) e **B.** Representante de indivíduo adulto (Comprimento padrão=23,8 cm). (Foto: Leandro Melo de Sousa).

Classificação taxonômica de *Baryancistrus xanthellus* estabelecida segundo o estudo de Lujan et al. (2015) segue abaixo:

Ordem: Siluriformes

Família: Loricariidae

Subfamília: Hypostominae

Gênero: *Baryancistrus*

Espécie: *Baryancistrus xanthellus*

Baryancistrus xanthellus é uma espécie tipicamente reofílica, comumente encontrada associada a ambientes com blocos e matacões de rocha e em corredeiras rasas, podendo ser capturada em ambientes de até 20 metros de profundidade com correnteza forte a moderada. São animais noturnos que, assim como a maioria dos Loricariidae, são classificados como detritívoros, alimentando-se praticamente de algas

e diatomáceas (ZUANON, 1999; L. M. SOUSA, com. pess.). Esta espécie se reproduz de julho a setembro, depositando os seus ovos em fendas de rochas, embaixo ou sobre as mesmas (ELETROBRAS, 2009).

As várias expedições realizadas nos últimos anos ao rio Xingu possibilitaram verificar e registrar uma variação nos padrões de pigmentação da espécie ao longo da sua área de distribuição. Foi possível observar pelo menos quatro aspectos nos padrões de pigmentação amarela em formato de pontos, distribuídos ao longo do corpo dos indivíduos de *B. xanthellus*: i) Pigmentação amarela intensa em forma de pontos grandes (maiores que um quarto do diâmetro ocular); ii) Pigmentação amarela intensa em forma de pontos pequenos (menores que um quarto do diâmetro ocular); iii) Pigmentação amarela esmaecida em forma de pontos pequenos (menores que um quarto do diâmetro ocular); iv) Ausência de pigmentação amarela em forma de pontos.

1. 5. *Baryancistrus* sp. “verde”

A espécie ainda não descrita conhecida como *Baryancistrus* sp. “verde” é diferenciada por ser totalmente verde, sem pontos claros ao longo do corpo e sem bandas claras nas margens distais das nadadeiras (Figura 4). Este morfotipo tem sido chamado de *Baryancistrus* sp. “verde” ou *Baryancistrus* sp. “marrom” em trabalhos científicos de levantamento ictiofaunístico e são conhecidos localmente pelos pescadores como acari-amarelinho-feio. Observações em campo sugerem que essa nova espécie possivelmente trata-se de uma variação morfológica de *B. xanthellus*, gerando, dessa forma, mais dúvidas em relação à real identidade dessa espécie, da real distribuição e estruturação populacional da mesma.



Figura 4. Imagem da suposta espécie nova *Baryancistrus* sp. “verde” (Comprimento padrão=11,4 cm). (Foto: Leandro Melo de Sousa).

1. 6. *Baryancistrus aff. niveatus*

A espécie ainda não descrita *Baryancistrus aff. niveatus*, conhecida localmente como acari-comum, é muito apreciada na pesca comercial e ornamental. É uma espécie de grande porte podendo chegar até 33 cm, caracterizada por ter um corpo escuro com presença de manchas brancas irregularmente distribuídas, que são numerosas nos adultos (CAMARGO et al., 2013) (Figura 5). São peixes encontrados em locais com forte correnteza, habitando fendas entre blocos rochosos.



Figura 5. Imagem da espécie nova *Baryancistrus aff. niveatus* (Comprimento padrão=13,1 cm). (Foto: Leandro Melo de Sousa).

1. 7. Marcadores Moleculares

Diante deste cenário de incertezas taxonômicas, abordagens moleculares se fazem essenciais. Atualmente, os marcadores moleculares são ferramentas importantes na área da conservação, pois possibilitam que sejam realizadas inferências sobre a história demográfica, tamanho populacional, fluxo gênico e estrutura da população (DRUMOND et al., 2005; STEINER et al., 2013). Além disso, a escolha correta do marcador pode ajudar na identificação de espécies com problemas na taxonomia e na detecção de espécies crípticas (SOLÉ-CAVA, 2001; ALLENDORF et al., 2010).

Alguns dos marcadores mais usados pertencem ao genoma mitocondrial (mtDNA). O DNA mitocondrial dos vertebrados é uma molécula circular formada por 37 genes, possuindo cerca de 17000 pares de bases. Dois destes genes codificam RNA ribossomal, 22 codificam diferentes moléculas de RNA transportador e 13 são codificadores de polipeptídeos. Além destes genes, o mtDNA possui também uma região controle, ou D-loop (*Displacement loop*), onde a replicação do DNA inicia (AVISE, 2009).

Os estudos com o uso do mtDNA tiveram início na década de 1970, e até os dias atuais ele é amplamente utilizado para estudos sobre a estrutura e história evolutiva recente de populações (BALLARD e WHITLOCK, 2004), devido às suas características peculiares que há muito tempo vem sendo discutidas no campo da genética, tais como a fácil amplificação devido a seu elevado número de cópias por célula, herança materna, taxa elevada de mutação, ausência de recombinação, ausência de íntron, além de ser considerado de evolução neutra (BROWN, 2008; GALTIER et al., 2009).

Dentre as regiões mitocondriais que são amplamente usadas no campo da genética temos o gene Citocromo b (Cyt b). O Citocromo b é uma enzima que está presente na cadeia respiratória do processo de respiração celular que ocorre na mitocôndria, chamada de subunidade catalítica central da ubiquinol citocromo *c* reductase. O Cyt b é um marcador amplamente utilizado em estudos populacionais, devido à presença de regiões conservadas e altamente variáveis (MEYER, 1994). Vários trabalhos realizados com peixes vem usando este marcador para realizar inferências filogeográficas, filogenéticas e divergências interes e intraespecífica (HARDMAN, 2004; GUO e ZHANG, 2005; KARTAVTSEV et al., 2007; HABIB et al., 2011; AN et al., 2012; SINGH et al., 2012; GORDEEVA e VOLKOV, 2016; LI et al., 2017).

Apesar de todas as características que tornam o DNA mitocondrial um marcador ideal para estudos genéticos, atualmente, vários artigos criticam o uso estrito deste marcador para a realização de inferências demográficas e estudos evolutivos de populações (GALTIER, et al., 2009). Por exemplo, a herança uniparental do mtDNA torna este marcador incapaz de fazer inferências precisas em casos de hibridização, separação incompleta de linhagens e introgressão (BERMINGHAM e MORITZ, 1998).

Com isso, a cada dia mais trabalhos vem sendo realizados onde além do uso do DNA mitocondrial também são sequenciados genes nucleares, permitindo assim um conhecimento mais profundo sobre a história evolutiva dos organismos (AVISE, 2009; LI et al., 2010).

Os genes do DNA nuclear são formados por regiões codificantes, os éxons, e regiões não codificantes, chamadas de íntrons. Para alguns genes, geralmente, os íntrons possuem uma variabilidade mais elevada, sendo considerados marcadores neutros, estando associados a regiões codificantes mais conservadas, os éxons, possuindo assim características ideais para estudos genéticos (CÔRTE-REAL et al., 1994; TOURIYA et al., 2003; CREER, 2007; LI et al., 2010).

1. 8. Justificativa

Apesar da sua rica diversidade, ainda são poucos os trabalhos realizados na região Neotropical que busquem avaliar a estrutura populacional das espécies, ocasionando a escassez de conhecimento acerca da formação das drenagens desta região, e da relação entre as espécies que nelas habitam. Quando falamos em trabalhos relacionados à família Loricariidae este número ainda é menor. Alguns dos trabalhos que se destacam são referentes ao gênero *Hypostomus*, como o estudo de Carvalho et al. (2015), realizado na bacia do rio Paraná, onde ele descreve o padrão filogeográfico da espécie *Hypostomus ancistroides*, verificando que durante o Quaternário as populações de *H. ancistroides* sofreram um processo de isolamento, mas que não foi capaz de causar especiação nessa espécie.

Em um outro estudo realizado na bacia do rio Paraná, Borba et al., (2013) buscou testar se as populações da espécie *Hypostomus strigaticeps* representam um grupo de espécies crípticas ou populações estruturadas. Eles constataram que as diferentes populações analisadas são representadas pela mesma espécie de *H. strigaticeps*.

Liedke (2007) estudou o padrão filogeográfico do gênero *Eurycheilichthys* fazendo com que seja possível conhecer os processos evolutivos que originaram este grupo endêmico para região sul do Brasil.

Até a presente data não existem trabalhos com descrições da estrutura genética de populações e limites interespecíficos entre as espécies do gênero *Baryancistrus*, não existindo desta forma nenhum trabalho que trate da história evolutiva da espécie *B. xanthellus*.

Diante da importância deste grupo para a região do Xingu e enorme variação morfocromática encontrada que impede a identificação acurada das espécies por meio de métodos taxonômicos clássicos em ictiologia, tornam-se necessários estudos utilizando sistemática molecular e filogeografia para uma melhor compreensão da história evolutiva desse grupo. Além disso, devido ao fato de que *B. xanthellus* ser uma espécie altamente valorizada no comércio de peixes ornamentais e que, vem passando por grandes ameaças com a construção de grandes projetos como a hidrelétrica de Belo Monte.

O barramento de um rio afeta diretamente sua dinâmica hidrológica, ocasionando a perda de habitats (SABAJ PEREZ, 2015; LEES et al., 2016) que para

esta espécie é essencial, pois ela está diretamente associada a ambientes de corredeiras, as quais estão desaparecendo com o barramento.

Portanto, o presente trabalho avaliou o status das espécies do gênero *Baryancistrus* que ocorrem no rio Xingu, utilizando o marcador mitocondrial Cyt b. Além disso utilizando marcadores do genoma mitocondrial (Cyt b) e nuclear (RPL3 e Prolactina), foi avaliada a estrutura genética populacional da espécie *B. xanthellus* com finalidade de revelar potenciais padrões de diferenciação da espécie relativas à evolução da paisagem geológica da bacia e criar subsídios para elaboração de estratégias eficazes para conservação da mesma.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar os limites interespecíficos das espécies do gênero *Baryancistrus* que ocorrem na bacia do rio Xingu e avaliar os padrões filogeográficos de *B. xanthellus* com finalidade de revelar potenciais padrões de diferenciação genética neste táxon em relação à evolução da paisagem geológica da bacia, utilizando marcadores mitocondriais e nucleares.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Verificar o status e validação taxonômica da espécie *Baryancistrus* sp. “verde”;
- ✓ Descrever a estruturação populacional de *B. xanthellus*;
- ✓ Realizar inferências sobre a história demográfica de *B. xanthellus*;
- ✓ Inferir o fluxo gênico e capacidade de dispersão entre as diferentes populações de *B. xanthellus* e testar a hipótese de que os diferentes sítios de amostragem representem áreas de endemismo independentes para a espécie.

LITERATURA CITADA

ALLENDORF, F. W., HOHENLOHE, P. A., LUIKART, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature Reviews**, 11: 697-709, 2010.

ALMEIDA, F.F.M. A evolução dos Crátons Amazônico e do São Francisco comparada com seus homólogos no hemisfério norte. In: Congresso Brasileiro de Geologia, 30, Recife, Anais. Recife: Sociedade Brasileira de Geologia, 1979. p.2393-2407

AN, H. S., KIM, M. J., LEE, J. W., LEE, W. O. Molecular identification of Korean catfish (Siluriformes) based on two genetic markers. **Genes & Genomics**, 34: 695-702,

2012.

ARMBRUSTER, J.W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 14: 1-80, 2004.

AVISE, J. C. Phylogeography: Retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36: 3-15, 2009.

BALLARD, W. J e WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, 13:729-744, 2004

BERMINGHAM, E e MORITZ C. Comparative Phylogeography: Concepts and Applications. **Molecular Ecology**, 7:36-39, 1998.

BORBA, R. S., ZAWADZKI, C. H., OLIVEIRA, C., PERDICES, A., PARISE-MALTEMPI, P. P., ALVES. A. L. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. **Neotropical Ichthyology**, 11:111-116, 2013

BRITSKI, H. A., SATO, Y., ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: (com chaves de identificação para peixes da bacia do São Francisco)**. Brasília: CODEVASP, 1988. 115p.

BROWN, K. H. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. **Journal of Fish Biology**, 2:355-374, 2008.

CAMARGO, M., GIARRIZZO, T., ISAAC, V. J., Review of the geographic distribution of fish fauna of the Xingu River Basin, Brazil. **Ecotropica**, 10: 123-147, 2004.

CAMARGO, M. e R. GHILARDI. **Entre a terra, as águas e os pescadores do médio rio Xingu: uma abordagem ecológica**. Belém, 216p, 2009.

CAMARGO, M., JUNIOR H. G., SOUSA, L. M., RAPP PY-DANIEL L. **Loricariids of the Middle Rio Xingu**. 2^o. Hannover: Panta Rhei; 2013.

CARVALHO, P. H., LIMA, S. M. Q., ZAWADZKI, C. H., OLIVEIRA, C., PINNA, M. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region. **Mitochondrial DNA, Early Online**, 1-7, 2015.

CASTELNAU, F. L. 1855. Poissons. In: Animaux nouveaux ou rares recueillis pendant l'expédition dans les parties centrales de l'Amérique du Sud, de Rio de Janeiro a Lima, et de Lima au Para; exécutée par ordre du gouvernement Français pendant les années 1843 a 1847. xii + 112p., pls. 1-50.

CÔRTE-REAL, H. B. S. M., DIXON, D. R., HOLLAND, P. S. W. H. Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. **Marine Biology**, 120: 407-413, 1994.

CRAMER, C. A. **Filogenia de duas famílias de cascudos (Siluriformes, Loricariidae), usando dados nucleares, mitocondriais e morfológicos.** Tese (Doutorado em Zoologia). Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009, 121 p.

CRAMER, C. A., BONATTO S. L., REIS, R. E. Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 59:43-52, 2011.

CREER, S. Choosing and Using Introns in Molecular Phylogenetics. **Evolutionary Bioinformatics**, 3:99-108, 2007.

DRUMMOND, A. J., RAMBAUT, A., SHAPIRO, B., PYBUS, O. G. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, 22:1185-1192, 2005.

ELETROBRAS. **AAI – Avaliação Ambiental Integrada dos Aproveitamentos Hidrelétricos da Bacia Hidrográfica do Rio Xingu** Brasília, vol. 19, 434 p. 2009

ESCHMEYER, W.N. e FONG, J. D. Catalog of Fishes: Genera, Species, References. < <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>, 2016.

FERRARIS, C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, 1418:1-548, 2007.

GALTIER, N., NABHOLZ, B., GLÉMIN, S., HURST, G. D. D. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, 18:4541–50, 2009.

GORDEEVA, N. V. e VOLKOV, A. A. A New Primer Set for amplification of the Cytochrome b Gene in Lantern Fishes (Myctophidae). **Journal of Ichthyology**, 56: 899-903, 2016.

GOULDING, M., BARTHEM, R., FERREIRA, E. **The Xingu and Tapajós rivers: Clearwater reflections.** In: The Smithsonian atlas of the Amazon. Washington and London: Smithsonian books, 2003. p. 135-145.

GUO, X., HE, S., ZHANG, Y. Phylogeny and biogeography of Chinese sisorid catfishes re-examined using mitochondrial cytochrome b and 16S rRNA gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 35: 344-362, 2005.

HABIB, M., LAKRA, W. S., MOHINDRA, V., KHARE, P., BARMAN, A. S., SINGH, A., LAL, K. K., PUNIA, P., KHAN, A. A. Evaluation of cytochrome b mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae: Perciformes). **Molecular Biology Reports**, 38: 841-846, 2011.

HAFFER, J. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. **Brazilian Journal of Biology**, 68: 917-947, 2008.

HARDMAN, M. The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome b and

nuclear recombination activating gene 2. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 30: 395-408, 2004.

KARTAVTSEV, Y. P., JUNG, S. O., LEE, Y. M., BYEON, H. K., LEE, J. S. Complete mitochondrial genome of the bullhead torrent catfish, *Liobagrus obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): Genome description and phylogenetic considerations inferred from the Cyt b and 16S rRNA genes. **Gene**, 396: 13-27, 2007.

KINDLE, E. M. The South American cat-fishes belonging to Cornell University. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 7:249-256, 1895.

LEES, A. C. C. A., PERES, P. M., FEARNSIDE, M., SCHNEIDER, J., ZUANON, A. S. Hydropower and the future of Amazonian biodiversity. **Biodiversity and Conservation**, 25:451-466, 2016.

LI, C., RIETHOVEN, M., MA, L. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes. **BMC evolutionary biology**, 10: 90, 2010.

LI, Y., LUDWIG, A., PENG, Z. Geographical differentiation of the *Euchiloglanis* fish complex (Teleostei: Siluriformes) in the Hengduan Mountain Region, China: Phylogeographic evidence of altered drainage patterns. **Ecology and Evolution**, 7: 928-940, 2017.

LIEDKE, A. M. R. **Filogenia e Filogeografia gênero *Eurycheilichthys* (Siluriformes: Loricariidae)**. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007, 47 p.

LUJAN, N. K., ARCER, M., ARBRUSTER, J. W. New Black *Baryancistrus* with Blue Sheen from the Upper Orinoco (Siluriformes: Loricariidae). **Copeia**, 1:50-56, 2009

LUJAN, N. K., HIDALGO, M., STEWART, D. J. Revision of *Panaque* (*Panaque*), with descriptions of three new species from the Amazon Basin (Siluriformes, Loricariidae). **Copeia**, 2010: 676-704, 2010.

LUJAN, N. K., ARMBRUSTER, J. W., LOVEJOY, N. R., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 82:269-288, 2015.

MEYER, A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. **Trends in Ecology & Evolution**, 8:278-280, 1994.

NELSON, J. S. T. C., GRANDE, M., WILSON, V. H. **Fishes of the World**. Wiley, 707 p. 2016.

RAPP PY-DANIEL, L., ZUANON, J., OLIVEIRA, R. R. Two new ornamental Loricariidae catfishes of *Baryancistrus* from rio Xingu drainage (Siluriformes: Hypostominae). **Neotropical Ichthyology**, 9: 241-252, 2011.

REIS, R. E., KULLANDER, S. O., FERRARIS JR, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. EDIPUCRS. Porto Alegre. 742 p. 2003.

REIS, R. E., PEREIRA, E. H. L., ARMBRUSTER, J.W. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 147: 277-299, 2006.

SABAJ PÉREZ, M. H. Where the Xingu Bends and Will Soon Break. **American Scientist**, 103: 395-403, 2015.

SINGH, M., LAKRA, W. S., BAHUGUNA, S. N. Cytochrome b gene sequence divergence of seven sisorid species of catfish genus *Glyptothorax* (siluriformes, sisoridae) from India. **Molecular Biology Reports**, 39: 4275-4282, 2012.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos. pp. 172-192, 2001.

STEINER, C. C., PUTNAM, A. S., HOECK, P. E. A., RYDER, O. A. Conservation Genomics of Threatened Animal Species. **Annual Review of Animal Biosciences**, 1: 261-281, 2013.

TOURIYA, A., RAMI, M., CATTANEO-BERREBI, G., IBANEZ, C., AUGROS, S., BOISSIN, E., DAKKAK, A., BERREBI, P. Primers for EPIC amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. **BioTechniques**, 35: 676-682, 2003.

WERNEKE, D. C., SABAJ, M. H., LUJAN, N. K., ARMBRUSTER J.W. *Baryancistrus demantoides* and *Hemiancistrus subviridis*, two new uniquely colored species of catfishes from Venezuela (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, 3:533-542, 2005.

WINEMILLER, K. O.; MCINTYRE, P. B.; CASTELLO, L.; FLUET-CHOUINARD, E.; GIARRIZZO, T.; NAM, S.; BAIRD, I. G.; DARWALL, W.; LUJAN, N. K.; HARRISON, I.; STIASSNY, M. L. J.; SILVANO, R. A. M.; FITZGERALD, D. B.; PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; ALBERT, J. S.; BARAN, E.; PETRERE JR. M.; ZARFL, C.; MULLIGAN, M.; SULLIVAN, J. P.; ARANTES, C. C.; SOUSA, L. M.; KONING, A. A.; HOEINGHAUS, D. J.; SABAJ, M.; LUNDBERG, J. G.; ARMBRUSTER, J.; THIEME, M. L.; PETRY, P.; ZUANON, J.; TORRENTE VILARA, G.; SNOEKS, J.; OU, C. ; RAINBOTH, W.; PAVANELLI, C. S.; AKAMA, A.; SOESBERGEN, A.; SÁENZ, L. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. **Science**, 351: 128-129, 2016.

ZUANON, J. A. S. **História natural da Ictiofauna de Corredeiras do rio Xingu, na região de Altamira, Pará**. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999, 197 p.

Este capítulo está formatado segundo normas da revista *Molecular Phylogenetics and Evolution*, disponível em: <http://www.elsevier.com/journals/molecular-phylogenetics-and-evolution/1055-7903/guide-for-authors>

Capítulo 2

DELIMITAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE *Baryancistrus* RAPP PY-DANIEL, 1989 (SILURIFORMES: LORICARIIDAE) DA BACIA DO RIO XINGU

**Delimitação molecular das espécies de *Baryancistrus* Rapp Py-Daniel, 1989
(Siluriformes: Loricariidae) da bacia do rio Xingu**

Keila Xavier Magalhães^a, Raimundo Darley Figueiredo da Silva^b, Renildo Ribeiro de Oliveira^c, Alany Pedrosa Gonçalves^d, Grazielle Fernanda Evangelista Gomes^e, Janice Muriel Fernandes Lima da Cunha^f, Leandro Melo de Sousa^{g*}

^aUniversidade Federal do Pará, UFPA, Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação, Campus de Altamira, PA, Laboratório de Ictiologia de Altamira - E-mail: keila-magalhaes@hotmail.com.br

^bUniversidade Federal do Pará, UFPA, Campus de Bragança, PA, Laboratórios de Genética Aplicada – E-mail: rfigueiredodasilva@gmail.com

^cInstituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, INPA, Programa de Pós-graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Manaus, AM, Brazil – E-mail: deoliveirarr@gmail.com

^dInstituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, INPA, Programa de Pós-graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Manaus, AM, Brazil – E-mail: alany.xingu@gmail.com

^eUniversidade Federal do Pará, UFPA, Campus de Bragança, PA, Laboratórios de Genética Aplicada – E-mail: graziellefeg@gmail.com.br

^fUniversidade Federal do Pará, UFPA, Campus de Bragança, PA, Laboratório de Ictiologia e Biodiversidade Subterrânea – E-mail: j.muriel.cunha@gmail.com.br

^gUniversidade Federal do Pará, UFPA, Campus de Altamira, PA, Laboratório de Ictiologia de Altamira – E-mail: leandro.m.sousa@gmail.com.br

*Corresponding author

Resumo

As espécies de *Baryancistrus* apresentam uma grande diversidade de padrões de coloração, que varia dependendo da localidade onde habitam. Estes padrões resultam nos vários morfotipos reconhecidos como código-L no comércio de peixes ornamentais. Nós utilizamos sequências de um fragmento do gene mitocondrial Cytocromo b para caracterizar e delimitar as espécies do gênero *Baryancistrus* que ocorrem na bacia do rio Xingu. De acordo com os nossos dados existem sete Unidades Taxonômicas Operacionais Molecular (MOTUs) de *Baryancistrus* para esta bacia, sendo que a suposta espécie nova *Baryancistrus* sp. “verde”, na verdade trata-se de uma variação de coloração de *B. xanthellus*, que neste trabalho, apareceu subdividida em cinco grupos pelo resultado do BAPS. A abordagem aqui empregada foi útil para delimitar as espécies de *Baryancistrus*, o que ressalta a importância da taxonomia integrativa combinando informações baseadas em identificação morfológica com dados moleculares, utilizando marcadores de DNA espécie-específicos. Isso torna possível o reconhecimento e/ou validação de espécies em grupos com taxonomia mal resolvida, contribuindo para um maior conhecimento da ictiodiversidade e a elaboração de planos de conservação.

Palavras-chave: Cytocromo b, Loricariidae, Marcadores moleculares, MOTUs

1. Introdução

O gênero *Baryancistrus* Rapp Py-Daniel, 1989 pertencente à família Loricariidae é representado por seis espécies: *Baryancistrus beggini* Lujan, Arce and Armbruster 2009, *Baryancistrus niveatus* (Castelnau, 1855), *Baryancistrus demantoides* Werneke, Sabaj, Lujan and Armbruster, 2005, *Baryancistrus longipinnis* (Kindle 1895), *Baryancistrus chrysolomus* Rapp Py-Daniel, Zuanon e de Oliveira, 2011, e *Baryancistrus xanthellus* Rapp Py-Daniel, Zuanon e de Oliveira, 2011.

As espécies de *Baryancistrus* podem ser diferenciadas dos demais gêneros de Loricariidae utilizando-se uma combinação de caracteres, tais como: presença de uma membrana hipertrofiada posterior ao último raio da nadadeira dorsal alcançando a placa de sustentação da nadadeira adiposa, (exceto *B. beggini* a qual está totalmente conectada ao espinho da nadadeira adiposa); pré-maxilas paralelas ao focinho com grande número de dentes e abertura branquial relativamente curta quando comparada a *Parancistrus* (Werneke et al., 2005; Rapp Py-Daniel et al., 2011).

Por apresentar uma grande diversidade de padrões de colorido, com cores vibrantes e bonitas, as espécies do gênero tornam-se muito requisitadas no comércio de peixes ornamentais (Camargo e Ghilardi, 2009; Rapp Py-Daniel et al., 2011). Além disso, algumas espécies apresentam uma grande variação de coloração (e. g. *B. xanthellus*) dependendo da localidade onde é coletada, fazendo com que uma mesma espécie apresente vários morfotipos reconhecidos com código-L (sistema de classificação não científica criada pela revista DATZ, Stawikowski, 1982). Esta grande variação pode-se tornar um problema para taxonomia clássica, principalmente em grupos onde o colorido é fundamental para a diferenciação das espécies, necessitando, assim, do uso de outras ferramentas, como técnicas moleculares para complementar os dados morfológicos, embasando de maneira mais acurada e robusta a determinação de espécies ou até mesmo identificando o polimorfismo em relação ao colorido.

Recentemente, duas espécies do gênero foram descritas para a bacia do rio Xingu: *B. chrysolomus* e *B. xanthellus*. Além destas, ao menos duas possíveis novas espécies são encontradas, *Baryancistrus* aff. *niveatus* e *Baryancistrus* sp. "verde". Essa última é caracterizada por apresentar o colorido totalmente verde, sem pontos claros ao longo do corpo e sem bandas claras nas margens distais das nadadeiras. Este morfotipo também é conhecido como *Baryancistrus* sp. "marrom" em alguns trabalhos científicos de levantamento ictiofaunístico. É conhecido localmente pelos pescadores ornamentais como "acari-amarelinho-feio". Interessante notar que "acari-amarelinho" é o nome

popular de *B. xantheus*, evidenciando o entendimento dos pescadores, ainda que empiricamente, sobre parentesco destas duas espécies.

Atualmente, os marcadores moleculares, além de serem úteis na identificação rápida de espécies, estão sendo usados para realizar a delimitação das mesmas, que é um fator importante em diversas áreas biológicas, pois permite conhecer a diversidade e distribuição das espécies, auxiliando na elaboração de estratégias eficazes para a conservação da biodiversidade (Agapow et al., 2004; Yang e Rannala, 2014).

A abordagem molecular usando DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido amplamente utilizada em estudos com peixes, pois o mtDNA tem se mostrado um marcador útil para fornecer informações de diferenças genéticas a nível de espécie (An et al., 2012; Pereira et al., 2013). Dentre as regiões do mtDNA que são usadas para estudos com peixes, destaca-se o gene citocromo b (Cyt b) que é uma região bem conservada, sendo considerada em vários trabalhos como uma ferramenta útil para identificação de espécies de peixes (Gordeeva e Volkov, 2016; Habib et al., 2011; Kartavtsev et al., 2007; Singh et al., 2012).

Portanto, considerando o cenário de incertezas taxonômicas relacionado às espécies que compõe *Baryancistrus* ocorrentes no rio Xingu, o objetivo do presente trabalho foi identificar as diferenças genéticas interespecíficas neste grupo, utilizando o marcador mitocondrial Cyt b e dessa forma auxiliar na identificação e diferenciação dessas espécies, contribuindo com a taxonomia e sistemática do grupo.

2. Material e métodos

2.1. Área de estudo e amostragem

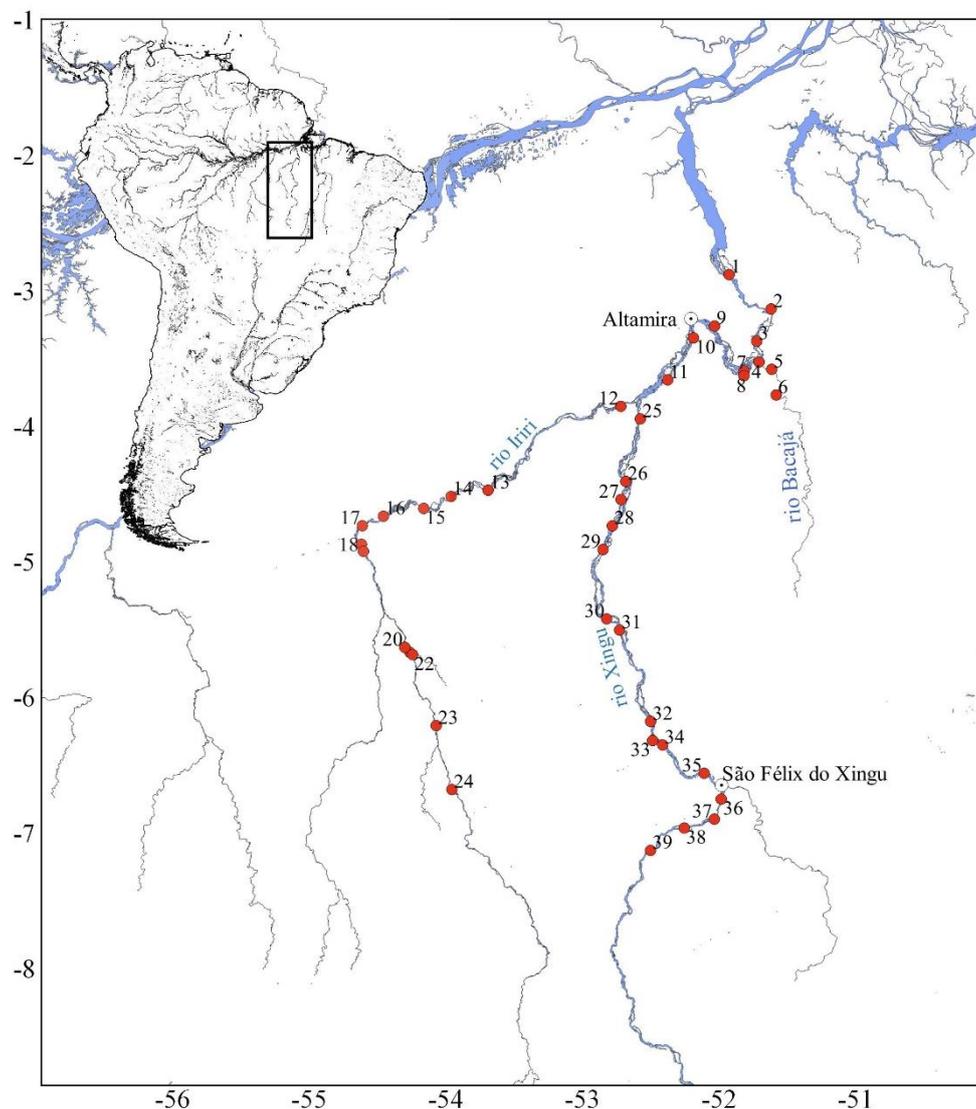


Fig. 1: Mapa dos pontos de amostragem de *Baryancistrus* ao longo do rio Xingu. 1: Vitória do Xingu; 2: Belo Monte; 3: Jericoá; 4: Percata; 5: Pariaxá; 6: Seca Farinha; 7: Ilha da fazenda; 8: Igarapé Itatá; 9: Cotovelo; 10: Gorgulho da Rita; 11: Boa Esperança; 12: Cachoeira Grande; 13: Boa Esperança (Resex); 14: Cachoeira das Minhocas; 15: Ilha do Papagaio; 16: Cachoerinha; 17: Ressaca da Califórnia; 18: Lajeiro; 19: São Lucas; 20: Bené; 21: Pousada; 22: Porto Zé Carlos; 23: Zéfa; 24: Irineu; 25: Xingu, acima da Confluência Xingu/Iriri; 26: Balisa; 27: Pedra Preta (Resex); 28: Estragado; 29: Morro Grande; 30: Bela Vista; 31: Bom Jardim; 32: São Gonçalo; 33: Serra do Pardo; 34: Travessão do Nazaré; 35: Araraquara; 36: Remansinho; 37: Xadai; 38: Pedra Preta; 39: Onça.

Foram realizadas coletas em 39 localidades ao longo da porção média da bacia do rio Xingu, desde a região de Vitória do Xingu a São Félix do Xingu. As coletas foram distribuídas em 24 pontos na calha principal do rio Xingu, 13 pontos no rio Iriri um de seus principais tributários e dois no rio Bacajá, um pequeno afluente da região da Volta Grande do rio Xingu (Tab. 1 e Fig. 1).

As coletas foram realizadas entre os anos de 2012 e 2016, obtendo um total de 420 indivíduos capturados de quatro espécies: *B. chrysolomus*, *Baryancistrus* aff. *niveatus*, *Baryancistrus* sp. “verde” e *B. xanthellus*. Todos os indivíduos tiveram amostras de tecido biológico coletadas, acondicionadas em tubos criogênicos, preservadas em álcool 96% e mantidas em freezer a -20° até a extração do DNA.

Todos os exemplares foram previamente identificados em campo com o auxílio de literatura especializada (Rapp Py-Daniel et al., 2011) e posteriormente confirmada a identificação em laboratório e depositados em coleções ictiológicas nas seguintes instituições: LIA, Laboratório de Ictiologia de Altamira, Universidade Federal do Pará, Brasil; INPA-ICT, Coleção de Peixes do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, AM, Brasil, e ANSP, *Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, PA, USA.

Tabela 1: Número de amostras das espécies de *Baryancistrus* que ocorrem no rio Xingu distribuídas por localidade de coleta.

Localidades	Nº de amostras por espécie			
	<i>B. xanthellus</i>	<i>B. aff. niveatus</i>	<i>B. chrysolomus</i>	<i>B. sp. "verde"</i>
1 Vitória do Xingu (XVX)				1
2 Belo Monte (XBM)	10	2		27
3 Jericoá (XJC)	21			1
4 Percata (BPT)	1	3		
5 Pariaxá (BPX)	13	4		
6 Seca Farinha (BSF)	10	1		
7 Ilha da fazenda (XIF)	30	6		
8 Igarapé Itatá (XII)	4			
9 Cotovelo (XCT)	23		9	
10 Gorgulho da Rita (XGR)	8			
11 Boa Esperança (XBE)	14	1		
12 Cachoeira Grande (ICG)	25	1	4	
13 Boa Esperança/Iriri (IBE)	1			
14 Cachoeira das Minhocas (ICL)	4			
15 Ilha do Papagaio (IIP)	5			
16 Cachoeirinha (ICA)	5			
17 Ressaca da Califórnia (IRC)	1			
18 Lajeiro (ILJ)	10			
19 São Lucas (ISL)	4			

Tabela 1 (Continuação): Número de amostras das espécies de *Baryancistrus* que ocorrem no rio Xingu distribuídas por localidade de coleta.

Localidades	Nº de amostras por espécie			
	<i>B. xanthellus</i>	<i>B. aff. niveatus</i>	<i>B. chrysolomus</i>	<i>B. sp. "verde"</i>
20 Bené (IBN)	6	1		
21 Pousada (IPD)	1	2		
22 Porto Zé Carlos (IPC)	8	2		
23 Zefá (IZF)	6			
24 Irineu (IIU)	1	5		
25 Acima da confluência (XCC)	5			
26 Balisa (XBL)	2			
27 Pedra Preta/Resex (XRP)	8			
28 Estragado (XED)	5			
29 Morro Grande (XMG)	1			
30 Bela Vista (XBV)	2			
31 Bom Jardim (XBJ)	2			
32 São Gonçalo (XSG)	5		4	
33 Serra do Pardo (XSP)	5			
34 Travessão do Nazaré (XTZ)	2		5	
35 Araraquara (XAR)	16	2		
36 Remasinho (XRE)	5			
37 Xadai (XXA)	15	4		
38 Pedra Preta (XPP)	15	4		
39 Onça (XON)	30	2		
TOTAL	329	40	22	29

2.2. Procedimentos laboratoriais

2.2.1. Isolamento do Material Genético e Regiões Genômicas

Para obtenção do material genético, foi utilizado o kit comercial *Wizard Genomic-PROMEGA*, conforme as instruções do fabricante. A qualidade do DNA obtido foi avaliada através de Eletroforese submarina horizontal, onde uma mistura de 2 µL de DNA e 2 µL Gel Red™ (BIOTIUM) foram aplicadas em minigel de agarose (1%) e migradas por 30 minutos, a 60 Volts. Após a realização da eletroforese, as amostras foram visualizadas em transiluminador sob luz UV e fotodocumentadas.

O fragmento do marcador mitocondrial Cyt b foi isolado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os iniciadores FishCytbF (5'-ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC-3') e TrucCytbR (5'-CCGACTTCCGGATTACAAGACCG-3') desenvolvidos por Sevilla et al. (2007).

A reação ocorreu com um volume final de 15 µL, sendo 2,4 µL de DNTP (1,25 mM), 1,5 µL de tampão (Buffer) (10x), 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,6 µL de cada

iniciador (50 ng/ μ L), 0,6 μ L de DNA total (aproximadamente 100 ng), 0,1 μ L de Taq DNA polimerase (5 U/ μ L) e água purificada para completar o volume final da reação. As condições de amplificação empregadas foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, hibridização a 55° por 35 segundos, e extensão a 72 °C por 50 segundos e uma extensão final a 72 °C por 2 minutos.

2.2.2. Sequenciamento

As amostras amplificadas foram purificadas com PEG (Polietileno Glicol) de acordo com o protocolo descrito por Paithankar e Prasad (1991) e em seguida submetidas à reação de sequenciamento utilizando o método formulado por Sanger et al. (1977), com os reagentes do *kit Big Dye (ABI PrismTMDyeTerminator CycleSequencing.ReadingReaction-Life Techlogies)*, sendo o produto precipitado submetido à eletroforese no sequenciador automático capilar ABI 3500 (*Applied Biosystems*).

2.2.3. Banco de dados

As sequências de DNA foram visualizadas e editadas manualmente utilizando o programa BioEdit (Hall, 1999). Após as correções, o alinhamento automático foi realizado no CLUSTALW (Thompson et al., 1994) implementado no BioEdit (Hall, 1999). A caracterização dos haplótipos (identificação do número e frequência nas populações), foi realizada no programa DNAsp (Librado e Rozas, 2009).

2.3. Análises populacionais

Para verificar a relação espacial e genealógica dos haplótipos das diferentes espécies analisadas foi construída uma rede de haplótipos no programa HAPLOVIEWER (Salzburger et al., 2011), obtida a partir de uma árvore de Máxima Verossimilhança implementada no programa PhyML (Guindon et al., 2010), de acordo com o modelo evolutivo sugerido pelo programa Kakusan (Tanabe, 2007).

Para identificar grupos genéticos divergentes foi realizada uma análise de estruturação populacional apenas com as espécies *B. xanthellus* e *Baryancistrus* sp. “verde”, utilizando a Análise Bayesiana de Estruturação Populacional (*Bayesian Analysis of Population Structure*), implementada no programa BAPS6 (Corander e Marttinen, 2006), onde o resultado encontrado foi utilizado para gerar a árvore guia para

a análise de delimitação. Nesta análise, o número de agrupamentos é definido usando um algoritmo Bayesiano que estima a distribuição das frequências alélicas de todas as populações em teste (Corander et al., 2003).

Os níveis de divergência genética inter e intrapopulacionais (distância P não corrigida), foram verificados no programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

2.4. Delimitação de espécies

A reconstrução das relações filogenéticas usando a abordagem de Máxima Verossimilhança foi realizada utilizando apenas uma sequência representante para cada haplótipo do banco. A análise foi conduzida no programa RAxML versão 8.1 (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis, 2006), sendo a significância dos agrupamentos da árvore estimada pela análise de *bootstrap*, gerada a partir de 1000 pseudoréplicas.

A delimitação de espécies foi conduzida no programa BPP versão 3.3 (*Bayesian Phylogenetics and Phylogeography*). Este programa usa uma árvore de espécies guia e gera distribuições *a posteriori* de modelos de delimitação de espécies (Yang e Rannala, 2010). Foi utilizada a topologia gerada pelo RAxML (bem como os agrupamentos visualizados no BAPS) como árvore guia usada no BPP para minimizar o número de cenários da delimitação de possíveis espécies. Portanto, foram assumidas oito Unidades Taxonômicas Operacionais Molecular (Molecular Operational Taxonomic Unit, MOTU) na análise, onde cada grupo formado no BAPS para *B. xanthellus* foi considerado como sendo um MOTU. Com a finalidade de testar o efeito de diferentes tamanhos efetivos (grande, pequeno e médio) sobre a delimitação de espécies, as simulações foram conduzidas sob três distintas combinações de priors ($\theta = 2\ 1000$, $\theta = 2\ 10000$, $\theta = 2\ 100000$ e $\tau = 2\ 1000$).

3. Resultados

Utilizando-se o marcador mitocondrial Cyt b (717pb) foram obtidas 327 sequências para *B. xanthellus* (123 haplótipo), 22 para *B. chrysolomus* (14 haplótipo), 40 para *Baryancistrus* aff. *niveatus* (8 haplótipo) e 29 para *Baryancistrus* sp. “verde” (15 haplótipo).

Na distribuição genealógica dos haplótipos das quatro morfo-espécies, foi verificada a presença de apenas três unidades monofiléticas de *Baryancistrus* para a região do médio Xingu, sendo que *Baryancistrus* sp. “verde”, até há pouco tempo

considerada uma espécie nova e em processo de descrição (L. Sousa e R. R. de Oliveira, informação pessoal), encontra-se compartilhando os mesmos haplótipos com *B. xanthellus* formando com este apenas um grupo. Já *B. chrysolomus* e *Baryancistrus* aff. *niveatus* foram recuperadas na análise como distintas entre si e de *B. xanthellus* por um grande número de passos mutacionais (Fig. 2).

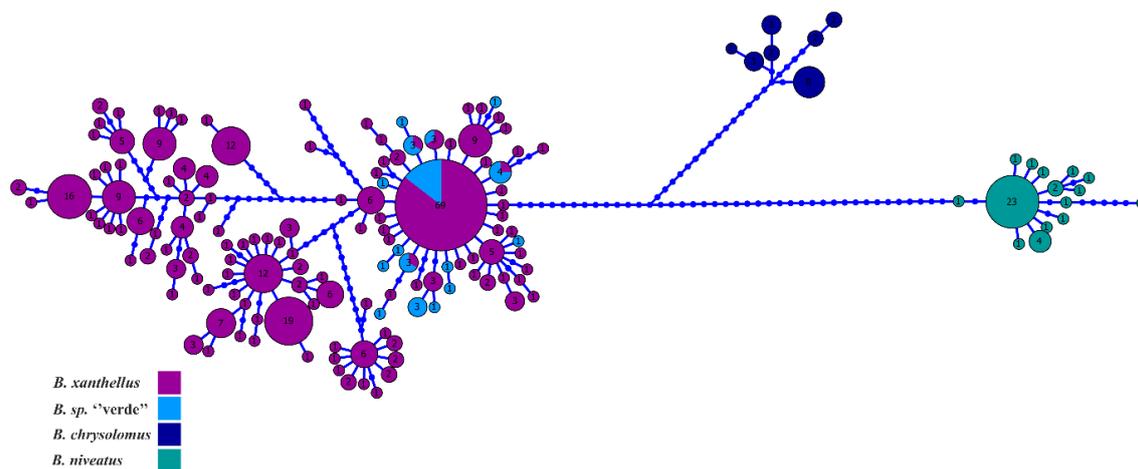


Figura. 2: Rede haplotípica representando a distribuição dos haplótipos das quatro morfoespécies de *Baryancistrus* que ocorrem no rio Xingu. As cores abaixo da rede representam as espécies.

Baseado no resultado da análise BAPS, não foi possível reconhecer *B. xanthellus* e *Baryancistrus* sp. “verde” como espécies distintas. Entretanto, as populações de *B. xanthellus* apresentaram-se estruturadas em cinco agrupamentos (Probabilidade=1). O primeiro grupo foi formado por indivíduos dos pontos (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 25) que compreendem a região da Resex do rio Iriri (Grupo A); o segundo grupo (2, 10, 26, 27, 28, 29, 30 e 31) com indivíduos da Resex do rio Xingu (Grupo B); o terceiro grupo (1, 2, 3, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) formado por indivíduos da Volta Grande do Xingu (Grupo C), no qual o morfotipo *Baryancistrus* sp. “verde” ficou inserido; o quarto grupo (32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39) formado com um número menor de indivíduos da região de São Félix do Xingu (Grupo D), e último e quinto grupo (20, 21, 22, 23 e 24) com um menor número de indivíduos da Estação Ecológica da Terra do Meio-Iriri (Grupo E) (Fig. 3).

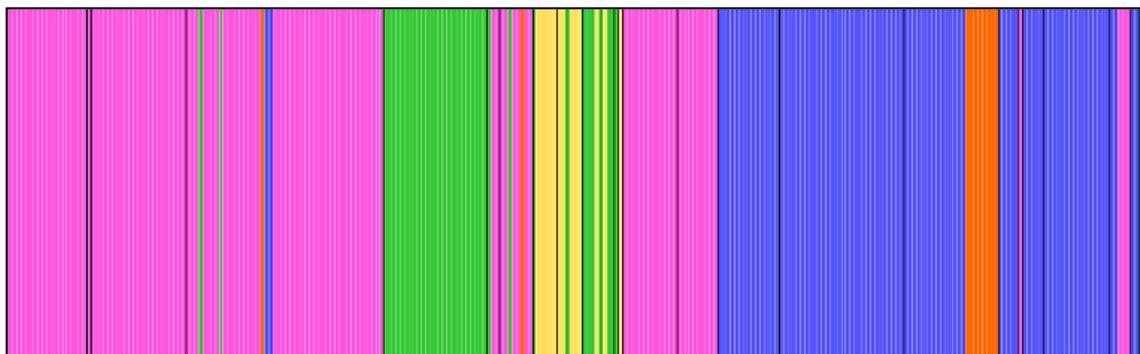


Fig. 3: Gráfico do resultado da análise bayesiana realizada no programa BAPS para estimar o número de agrupamentos nas populações de *B. xanthellus* e *B. sp.* “verde” ao longo do médio rio Xingu evidenciando cinco grupos indicados pelas cores Verde (Grupo A), Laranja (Grupo B), Rosa (Grupo C), Azul (Grupo D) e Amarelo (Grupo E).

Quanto à delimitação molecular de espécies, assumindo a existência de oito MOTUs, o resultado da análise de delimitação, gerou uma árvore com probabilidades 1 para quase todos os nós, com exceção para *Baryancistrus sp.* “verde”, que apresenta valores de probabilidade posteriori próximos a zero, não obtendo, portanto, suporte como uma espécie válida (Fig. 4).

Na árvore de Máxima Verossimilhança realizada apenas com os haplótipos das quatro morfo-espécies estudadas, é possível ver a separação entre as espécies *B. chrysolomus*, *Baryancistrus aff. niveatus*, *B. xanthellus* mais uma vez veio separada em cinco grupos com *Baryancistrus sp.* “verde” fazendo parte de uma das suas populações, corroborando os resultados encontrados na análise Bayesiana (*Bayesian Phylogenetics and Phylogeography*) (Fig. 5). Portanto, estima-se a presença de sete MOTUS de *Baryancistrus* para a bacia do rio Xingu.

A distância genética entre os grupos gerados pelo BAPS, incluindo *Baryancistrus sp.* “verde” dentro de *B. xanthellus* e as espécies *Baryancistrus aff. niveatus* e *B. chrysolomus*, variou de 0,015 a 0,072 entre *B. xanthellus* (Grupo A) e *B. xanthellus* (Grupo C) e *Baryancistrus aff. niveatus* e *B. xanthellus* (Grupo B), respectivamente (Tab. 2).

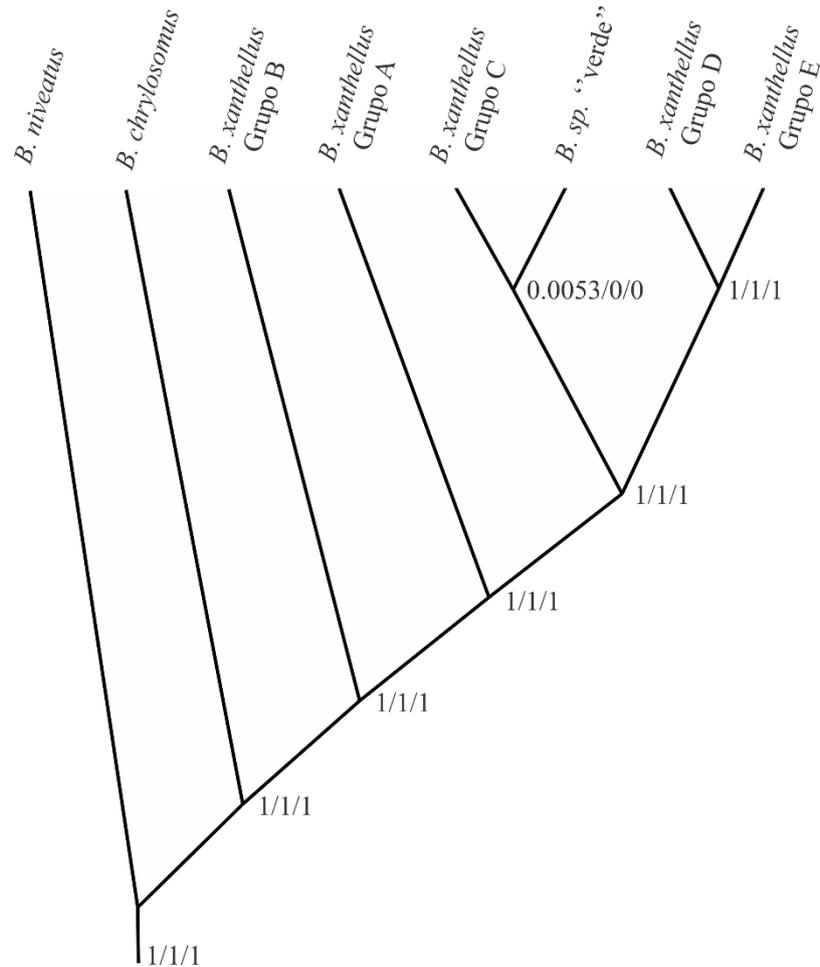


Fig. 4: Cladograma com resultado da análise Bayesiana de delimitação para as espécies do gênero *Baryancistrus* do médio rio Xingu, assumindo uma árvore guia com oito espécies. Os valores dos nós, são referentes ao tamanho populacional grande, médio e pequeno, respectivamente.

Tabela 2: Distância genética p (não corrigida) entre as espécies *B. chrysolomus*, *Baryancistrus* aff. *niveatus* e os agrupamentos de *B. xanthellus* formados pelo BAPS.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>B. niveatus</i>		0,008	0,009	0,008	0,008	0,009	0,009
2 <i>B. chrysolomus</i>	0,065		0,007	0,007	0,007	0,007	0,007
3 <i>B. xanthellus</i> (Grupo B)	0,072	0,048		0,005	0,005	0,006	0,006
4 <i>B. xanthellus</i> (Grupo A)	0,063	0,047	0,024		0,004	0,005	0,005
5 <i>B. xanthellus</i> (Grupo C)	0,062	0,046	0,023	0,015		0,005	0,004
6 <i>B. xanthellus</i> (Grupo D)	0,068	0,049	0,036	0,028	0,023		0,005
7 <i>B. xanthellus</i> (Grupo E)	0,064	0,047	0,030	0,025	0,018	0,020	

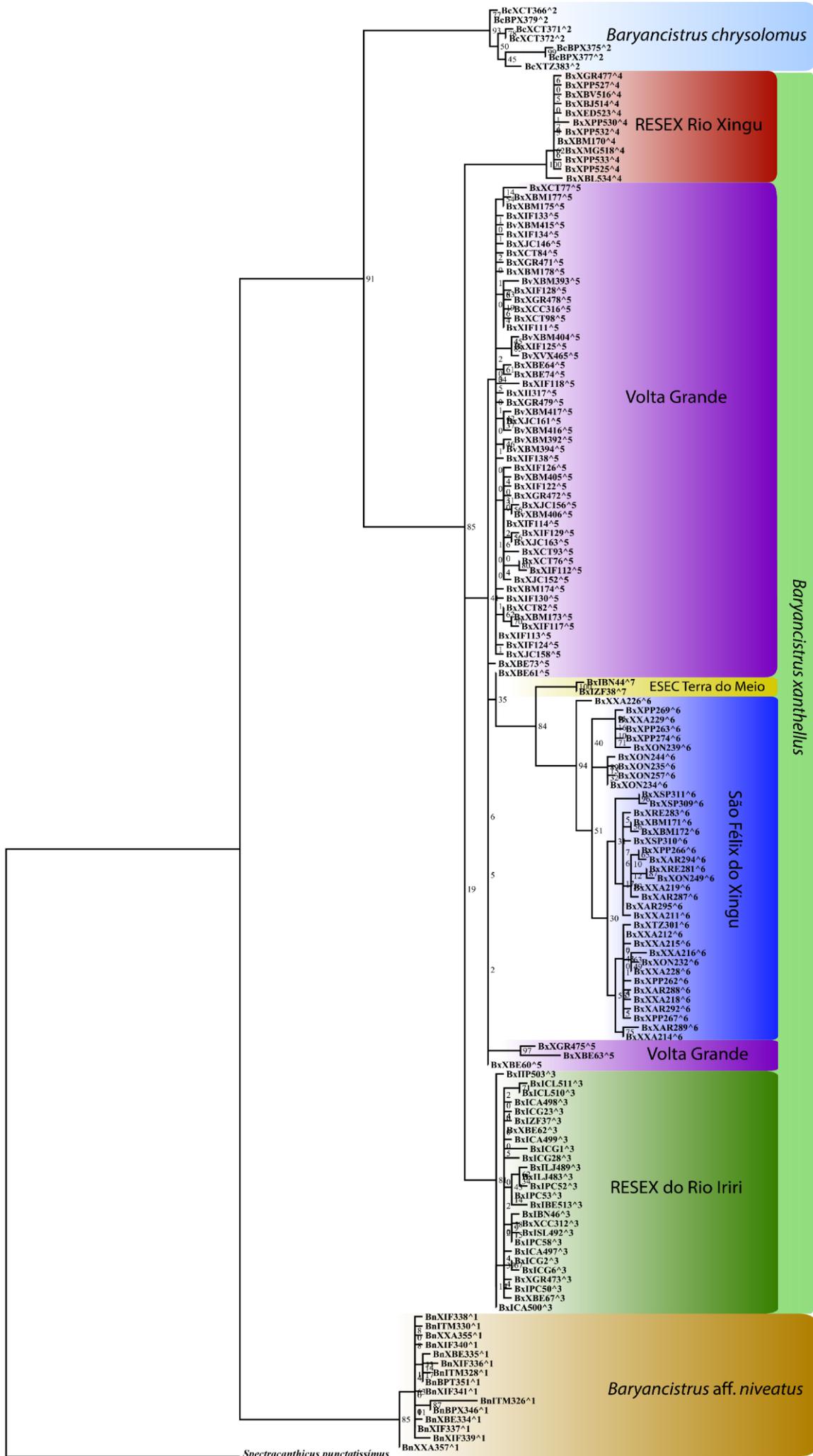


Fig. 5: Árvore de Máxima Verossimilhança obtida a partir do fragmento mitocondrial Cyt b. As diferentes cores representam as espécies dentro dos grupos reveladas pelo resultado da delimitação de espécies. Tons em roxo representam o grupo da Volta Grande do Xingu; verde: Resex do rio Iriri; azul: São Félix do Xingu; vermelho: Resex do rio Xingu; amarelo: Estação Ecológica da Terra do Meio. As siglas Bx, Bn, Bc e Bv são referentes ao nome das espécies, sendo Bx: *B. xanthellus*; Bn: *Baryancistrus* aff. *niveatus*; Bc: *B. chrysolomus* e Bv: *Baryancistrus* sp. “verde”.

4. Discussão

São enumerados cerca de 24 diferentes conceitos de espécies, todos em sua maioria conflitantes (Mayden, 1997). Esses vários conceitos, frequentemente levam a discordâncias sobre limites ou números de espécies (De Queiroz, 2007; Willis, 2017). A adoção equivocada de um conceito de espécie pode levar ao reconhecimento de um número errôneo de espécies, comprometendo estudos futuros e dificultando medidas eficazes de conservação das mesmas (Wiens, 2007).

Tradicionalmente, as espécies são descritas fazendo-se uso de caracteres morfológicos, no entanto, o uso exclusivo de caracteres com alto polimorfismo e plasticidade fenotípica na sistemática filogenética e taxonomia pode levar a várias inconsistências devido à forte influência da seleção natural na evolução de traços morfológicos convergentes (Yang e Rannala, 2014). Atualmente, os dados moleculares fornecem informações adicionais sobre muitos fatores relacionados à identificação de espécies, principalmente em casos de espécies crípticas (Fujita et al., 2012).

Em diversos casos, os cenários de delimitação de espécies obtidos com caracteres morfológicos e moleculares mostram incongruências. Um bom exemplo em Loricariidae é reportado para o gênero *Neoplecostomus*, no qual foram verificadas incongruências entre o número de espécies apontadas pelos dados moleculares em comparação com os dados morfológicos. Os métodos moleculares delimitaram de nove a 11 espécies, ao passo que a taxonomia clássica reconhece 13 espécies válidas para o grupo (Roxo et al., 2015). Willis et al. (2012) estudando os ciclídeos amazônicos do gênero *Cichla*, utilizando dados multilocus, também observaram um menor número de espécies do que a taxonomia morfológica permitiu reconhecer para esse grupo de peixes. Harrington e Near (2012) encontraram esse mesmo padrão para o gênero *Etheostoma*, peixes nativos da América do Norte, no qual foram reconhecidas apenas três espécies válidas das seis propostas com base em caracteres morfológicos. É possível encontrar exemplos com essa mesma divergências em outros grupos como nas

Salamandras (Amphibia) *Pachytriton brevipes* (Wu e Murphy, 2015) e em Insetos *Ophion Fabricius* (Schwarzfeld e Sperling, 2015).

Os agrupamentos do BAPS revelaram que *B. xanthellus* e *Baryancistrus* sp. “verde” são geneticamente similares, indicando que o morfotipo “verde” seria paenas uma população de *B. xanthellus* ocorrente na Volta Grande do rio Xingu, resultado corroborado por diferentes análises. Nesse contexto, alguns estudos vem demonstrando a eficiência do uso de métodos de agrupamento bayesiano, como o BAPS para a posterior inferência de número de espécies, via métodos de delimitação de espécies. Por exemplo, Dejacó et al. (2016) encontraram resultados relevantes utilizando esta análise para delimitar espécies de insetos do gênero *Machilis*, apoiando dessa forma o uso do BAPS para estudos de delimitação. Estudando uma espécie de lagarto endêmica do Cerrado, *Norops meridionalis*, Guarnizo et al. (2016) também utilizaram esta ferramenta para inferir o número de agrupamentos dentro da espécie e assim realizar a delimitação por meio do BPP, verificando que os agrupamentos identificados possuíam uma alta probabilidade de serem espécies distintas.

No presente estudo a utilização do método BPP para delimitação de espécies permitiu discriminar os diferentes grupos dentro das populações de *B. xanthellus*. Além de elucidar as dúvidas em relação ao morfotipo *Baryancistrus* sp. “verde”, evidenciando não se tratar, afinal, de uma espécie nova, mas provavelmente uma variação fenotípica de *B. xanthellus*. Cabe ressaltar que este fenótipo “verde” já era conhecido por pescadores ornamentais locais como “acari-amarelinho-feio” por não apresentar pintas cobrindo todo o seu corpo.

Este método para delimitar espécies já foi usado em outros trabalhos. Ruane et al. (2014) fez uso do BPP para delimitar as espécies de um grupo de cobras do gênero *Lampropeltis* utilizando o marcador Cyt b, verificando que este grupo apresenta um maior número de espécies. Para Profundulidae, uma família de peixes da ordem Cyprinodontiformes, a análise Bayesiana forneceu evidências que a diversidade taxonômica para este grupo é bem maior do que já havia sido registrado (Morcillo et al., 2016). Utilizando a mesma análise, Lamanna et al. (2016) propôs a delimitação para espécies da família de peixes elétricos africana (Mormyridae), sendo possível ainda confirmar a presença de uma espécie não descrita.

No presente estudo, a delimitação foi abordada utilizando apenas o marcador mitocondrial Cyt b. Embora o BPP seja um método multilocus para delimitação de espécies, ele produz resultados confiáveis com altas probabilidades de suporte usando

apenas um locus (Yang e Rannala, 2016). Além disso, diversos trabalhos realizados com diferentes espécies de peixes, vem demonstrando que o gene Cyt b é um marcador valioso para a detecção de diferenças genéticas tanto interespecíficas como intraespecífica (An et al., 2012; DiBattista et al., 2013; Gordeeva e Volkov, 2016; Guo et al., 2005; Habib et al., 2011; Hardman, 2004; Kartavtsev et al., 2007; Li et al., 2017; Singh et al., 2012).

A topologia mostrada na árvore de Máxima Verossimilhança corresponde ao que foi encontrado na trabalho de Lujan et al. (2015) onde *Baryancistrus* aff. *niveatus* foi recuperado como grupo irmão de todas as outras espécies do gênero para o rio Xingu, além de corroborar os resultados encontrados para Cyt b, não suportando *Baryancistrus* sp. “verde” como espécie válida, mas sim uma variação dentro de *B. xanthellus*.

Em observações realizadas em campo, foi possível verificar um gradiente na variação do padrão de colorido na população de *B. xanthellus*. Próximo ao ponto conhecido como Jericoá na Volta Grande do Xingu, alguns exemplares sem pintas amarelas aparecem na população de *B. xanthellus* (com o colorido correspondente ao descrito por Rapp Py-Daniel et al., 2011), ao passo que em Belo Monte, onde a população é quase toda sem pintas (*Baryancistrus* sp. “verde”), podem-se encontrar exemplares com os pintas amarelas ao longo do corpo, porém em frequência muito mais baixa.

Nossos resultados evidenciam a ocorrência de sete MOTUs de *Baryancistrus* para a bacia do rio Xingu, sendo cinco apenas dentro de *B. xanthellus* e as demais sendo *B. chrysolomus* e *Baryancistrus* aff. *niveatus*. Não foi possível reconhecer *B. xanthellus* e *Baryancistrus* sp. “verde” como espécies distintas, revelando que essa espécie possui uma distribuição mais ampla do que previamente reportado.

Os altos valores de divergência genética encontrados entre as linhagens de *B. xanthellus* chega a ser expressivo quando comparados com os valores de distância desta espécie com outras do grupo *Baryancistrus*, o que sugere que esta espécie na verdade trata-se de um complexo de espécies crípticas. Esta diversidade críptica torna-se um desafio quando estudamos espécies exploradas comercialmente, pois a mesma é vendida no comércio de aquarofilia como sendo apenas uma espécie, fazendo com que o impacto da pesca comercial seja alto. Este fato associado a instalação e funcionamento da usina de Belo Monte culminam na redução do número populacional. O barramento de um rio altera sua dinâmica hidrológica ocasionando perda de habitat em áreas de corredeiras, ambientes cruciais para a sobrevivência desse grupo de peixes, além de

influenciar diretamente na disponibilidade de alimentos (Sabaj Perez, 2015; Lees et al., 2016). Esses fatores colocam em risco de extinção várias espécies.

O reconhecimento de espécies com problemas na taxonomia é de enorme importância para a conservação biológica, ainda mais se tratando de um grupo de peixes altamente explorado no comércio de peixes ornamentais, que vem sofrendo constantemente com a ameaça de perda de hábitat devido à construção de grandes empreendimentos nos rios da Amazônia (Winemiller et al., 2016). A grande semelhança morfológica encontrada entre alguns representantes do gênero *Baryancistrus* torna o uso de marcadores moleculares essencial para a identificação das espécies.

Esses resultados ressaltam a importância da taxonomia integrativa combinando informações baseadas em identificação morfológica com dados moleculares, utilizando marcadores de DNA espécie-específicos. Isso torna possível o reconhecimento e/ou validação de espécies em grupos com taxonomia mal resolvida, contribuindo para um maior conhecimento da ictiodiversidade e a elaboração de planos de conservação.

Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe do Projeto de Monitoramento da Ictiofauna da UHE Belo Monte pela disponibilização do material para estudo; ao ICMbio, pelas coletas nas Reservas Extrativistas do Xingu e do Iriri, Parque Nacional da Serra do Pardo e Estação Ecológica da Terra do Meio. Agradecem também aos colegas dos Laboratórios de Ictiologia de Altamira (UFPA/Altamira), Genética Aplicada (UFPA/Bragança) e de Ictiologia e Biodiversidade Subterrânea da Amazônia (UFPA/Bragança).

Financiamento

Projeto iXingu (NSF- DEB-1257813), projeto Universal CNPq (processo 486376/2013-3) e FAPESPA/VALE S. A., pelo apoio financeiro para obtenção dos dados moleculares (ICAAF 043/2011) sob coordenação de J.Murial-Cunha.

Referências

Agapow, P.-M., Bininda-Emonds, O.R.P., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C., Purvis, A., 2004. The Impact of Species Concept on Biodiversity Studies. *Q. Rev. Biol.* 79, 161–179. doi:10.1086/383542

- An, H.S., Kim, M.-J., Lee, J.W., Lee, W.-O., 2012. Molecular identification of Korean catfish (Siluriformes) based on two genetic markers. *Genes Genomics* 34, 695–702. doi:10.1007/s13258-012-0131-8
- Camargo, M., Ghilardi, R., 2009. Entre a terra, as águas e os pescadores do médio rio Xingu: uma abordagem ecológica. Belém.
- Corander, J., Marttinen, P., 2006. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Mol. Ecol.* 15, 2833–2843. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02994.x
- Corander, J., Waldmann, P., Sillanpää, M.J., 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163, 367–374. doi:DOI 10.1093/bioinformatics/bth250
- De Queiroz, K., 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Syst. Biol.* 56, 879–886. doi:10.1080/10635150701701083
- Dejaco, T., Gassner, M., Arthofer, W., Schlick-Steiner, B., Steiner, F., 2016. Species Delimitation in Jumping Bristletails. *Syst. Biol.* doi:10.1093/sysbio/syw003.
- DiBattista, J.D., Berumen, M.L., Gaither, M.R., Rocha, L.A., Eble, J.A., Choat, J.H., Craig, M.T., Skillings, D.J., Bowen, B.W., 2013. After continents divide: comparative phylogeography of reef fishes from the Red Sea and Indian Ocean. *J. Biogeogr.* 40, 1170–1181. doi:10.1111/jbi.12068
- Fujita, M.K., Leaché, A.D., Burbrink, F.T., McGuire, J.A., Moritz, C., 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 27, 480–488. doi:10.1016/j.tree.2012.04.012
- Gordeeva, N. V., Volkov, A.A., 2016. A new primer set for amplification of the cytochrome b gene in lantern fishes (Myctophidae). *J. Ichthyol.* 56, 899–903. doi:10.1134/S0032945216060059
- Guarnizo, C.E., Werneck, F.P., Giugliano, L.G., Santos, M.G., Fenker, J., Sousa, L., D'Angiolella, A.B., dos Santos, A.R., Strüssmann, C., Rodrigues, M.T., Dorado-Rodrigues, T.F., Gamble, T., Colli, G.R., 2016. Cryptic lineages and diversification of an endemic *Anole lizard* (Squamata, Dactyloidae) of the Cerrado hotspot. *Mol. Phylogenet. Evol.* 94, 279–289. doi:10.1016/j.ympev.2015.09.005

- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321. doi:10.1093/sysbio/syq010
- Guo, X., He, S., Zhang, Y., 2005. Phylogeny and biogeography of Chinese sisorid catfishes re-examined using mitochondrial cytochrome b and 16S rRNA gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 35, 344–362. doi:10.1016/j.ympev.2004.12.015
- Habib, M., Lakra, W.S., Mohindra, V., Khare, P., Barman, A.S., Singh, A., Lal, K.K., Punia, P., Khan, A.A., 2011. Evaluation of cytochrome b mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae: Perciformes). *Mol. Biol. Rep.* 38, 841–846. doi:10.1007/s11033-010-0175-2
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* doi:citeulike-article-id:691774
- Hardman, M., 2004. The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome b and nuclear recombination activating gene 2. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30, 395–408. doi:10.1016/S1055-7903(03)00203-3
- Harrington, R.C., Near, T.J., 2012. Phylogenetic and coalescent strategies of species delimitation in *Snubnose darters* (Percidae: Etheostoma). *Syst. Biol.* 61, 63–79. doi:10.1093/sysbio/syr077
- Kartavtsev, Y.P., Jung, S.-O., Lee, Y.-M., Byeon, H.-K., Lee, J.-S., 2007. Complete mitochondrial genome of the bullhead torrent catfish, *Liobagrus obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): Genome description and phylogenetic considerations inferred from the Cyt b and 16S rRNA genes. *Gene* 396, 13–27. doi:10.1016/j.gene.2007.01.027
- Kindle, E. M., 1895. The South American cat-fishes belonging to Cornell University. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 7, 249-256.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054

- Lamanna, F., Kirschbaum, F., Ernst, A.R.R., Feulner, P.G.D., Mamonekene, V., Paul, C., Tiedemann, R., 2016. Species delimitation and phylogenetic relationships in a genus of African weakly-electric fishes (Osteoglossiformes, Mormyridae, *Campylomormyrus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 101, 8–18.
doi:10.1016/j.ympev.2016.04.035
- Lees, C.C.C.A., Peres, P.M., Fearnside, M., Schneider, J., Zuanon, A.S., 2016. Hydropower and the future of Amazonian biodiversity. *Biodivers. Conserv.* 25, 451–466. doi: 10.1007/s10531-016-1072-3
- Li, Y., Ludwig, A., Peng, Z., 2017. Geographical differentiation of the *Euchiloglanis* fish complex (Teleostei: Siluriformes) in the Hengduan Mountain Region, China: Phylogeographic evidence of altered drainage patterns. *Ecol. Evol.* 7, 928–940.
doi:10.1002/ece3.2715
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5 : A software for comprehensive analysis of DNA poly- morphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Lujan, N., Arce, M., Armbruster, J., 2009. A New Black *Baryancistrus* with Blue Sheen from the Upper Orinoco (Siluriformes: Loricariidae). *Copeia* 2009, 50–56.
doi:10.1643/CI-07-187
- Lujan, N.K., Armbruster, J.W., Lovejoy, N.R., López-Fernández, H., 2015. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 82, 269–288. doi:10.1016/j.ympev.2014.08.020
- Mayden, R.L., 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem, in: Hall, C.& (Ed.), *Species: The Units of Biodiversity*. London, New York, pp. 381–424. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(97)85758-8
- Morcillo, F., Ornelas-García, C.P., Alcaraz, L., Matamoros, W.A., Doadrio, I., 2016. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the Mesoamerican endemic freshwater fish family Profundulidae (Cyprinodontiformes: Actinopterygii). *Mol. Phylogenet. Evol.* 94, 242–251. doi:10.1016/j.ympev.2015.09.002
- Paithankar, K.R., Prasad, K.S., 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.* 19, 1346. doi:http://dx.doi.org/10.1093/nar/19.6.1346

- Pereira, L.H., Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C., 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genet.* 14, 20. doi:10.1186/1471-2156-14-20
- Rapp Py-Daniel, L., 1989. Redescription of *Parancistrus aurantiacus* (Castelnau, 1855) and preliminary establishment of two new genera: *Baryancistrus* and *Oligancistrus* (Siluriformes, Loricariidae). *Cybium* 13, 235–246.
- Rapp Py-Daniel, L., Zuanon, J., de Oliveira, R.R., 2011. Two new ornamental loricariid catfishes of *Baryancistrus* from rio Xingu drainage (Siluriformes: Hypostominae). *Neotrop. Ichthyol.* 9, 241–252. doi:10.1590/S1679-62252011000200001
- Roxo, F.F., Ochoa, L.E., Costa-Silva, G.J., Oliveira, C., 2015. Species delimitation in *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) using morphologic and genetic approaches. *DNA Barcodes* 3, 110–117. doi:10.1515/dna-2015-0014
- Ruane, S., Bryson, R.W., Pyron, R.A., Burbrink, F.T., 2014. Coalescent species delimitation in Milksnakes (Genus *Lampropeltis*) and impacts on phylogenetic comparative analyses. *Syst. Biol.* 63, 231–250. doi:10.1093/sysbio/syt099
- Sabaj Pérez, M.H., 2015. Where the Xingu Bends and Will Soon Break. *Am. Sci.* 103, 395–403. doi: 10.1511/2015.117.395
- Salzburger, W., Ewing, G.B., Von Haeseler, A., 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Mol. Ecol.* 20, 1952–1963. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05066.x
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, a R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5468. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Sevilla RG, Diez A, Norén M, Mouchel O, Jérôme M, Verrez-Bagnis V, et al., 2007. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Mol Ecol Notes.* 7, 730–734.
- Schwarzfeld, M.D., Sperling, F.A.H., 2015. Comparison of five methods for delimitating species in *Ophion Fabricius*, a diverse genus of parasitoid wasps (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 93, 234–248.

doi:10.1016/j.ympcv.2015.08.003

Singh, M., Lakra, W.S., Bahuguna, S.N., Kartavtsev, Y.P., 2012. Cytochrome b gene sequence divergence of seven sisorid species of catfish genus *Glyptothorax* (Siluriformes, Sisoridae) from India. *Mol. Biol. Rep.* 39, 4275–4282.

doi:10.1007/s11033-011-1214-3

Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.

doi:10.1093/bioinformatics/btl446

Tanabe, A.S., 2007. Kakusan: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Mol. Ecol. Notes* 7, 962–964. doi:10.1111/j.1471-

8286.2007.01807.x

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673

Werneke, D.C., Sabaj, M.H., Lujan, N.K., Armbruster, J.W., 2005. *Baryancistrus demantoides* and *Hemiancistrus subviridis*, two new uniquely colored species of catfishes from Venezuela (Siluriformes: Loricariidae). *Neotrop. Ichthyol.* 3, 533–542. doi:10.1590/S1679-62252005000400011

Wiens, J.J., 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Syst. Biol.* 56, 875–878. doi:10.1080/10635150701748506

Willis, S.C., Macrander, J., Farias, I.P., Ortí, G., 2012. Simultaneous delimitation of species and quantification of interspecific hybridization in Amazonian peacock cichlids (Genus *Cichla*) using multi-locus data. *BMC Evol. Biol.* 12, 96.

doi:10.1186/1471-2148-12-96

Willis, S.C., 2017. One species or four? Yes!...and, no. Or, arbitrary assignment of lineages to species obscures the diversification processes of Neotropical fishes.

Plos One, ONE 12, e0172349. doi:10.1371/journal.pone.0172349

Winemiller, K.O., McIntyre, P.B., Castello, L., Fluet-Chouinard, E., Giarrizzo, T., Nam,

- S., Baird, I.G., Darwall, W., Lujan, N.K., Harrison, I., Stiassny, M.L.J., Silvano, R.A.M., Fitzgerald, D.B., Pelicice, F.M., Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Albert, J.S., Baran, E., Petrere, M., Zarfl, C., Mulligan, M., Sullivan, J.P., Arantes, C.C., Sousa, L.M., Koning, A.A., Hoeinghaus, D.J., Sabaj, M., Lundberg, J.G., Armbruster, J., Thieme, M.L., Petry, P., Zuanon, J., Vilara, G.T., Snoeks, J., Ou, C., Rainboth, W., Pavanelli, C.S., Akama, A., Soesbergen, A. v., Saenz, L., 2016. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. *Science* (80-.). 351, 128–129. doi:10.1126/science.aac7082
- Wu, Y., Murphy, R.W., 2015. Concordant species delimitation from multiple independent evidence: A case study with the *Pachytriton brevipes* complex (Caudata: Salamandridae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 92, 108–117. doi:10.1016/j.ympev.2015.06.010
- Yang, Z., Rannala, B., 2016. Species Identification by Bayesian Fingerprinting: A Powerful Alternative to DNA Barcoding, bioRxiv. doi:10.1101/041608
- Yang, Z., Rannala, B., 2014. Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. *Mol. Biol. Evol.* 31, 3125–3135. doi:10.1093/molbev/msu279
- Yang, Z., Rannala, B., 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9264–9269. doi:10.1073/pnas.0913022107

Este artigo foi formatado segundo normas da revista *Plos One*, disponíveis em <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

Capítulo 3

FILOGEOGRAFIA DE *Baryancistrus xanthellus* RAPP PY-DANIEL, ZUANON E DE OLIVEIRA, 2011 (SILURIFORMES: LORICARIIDAE), UM PEIXE ENDÊMICO DA BACIA DO RIO XINGU

1 Filogeografia de *Baryancistrus xanthellus* Rapp Py-Daniel, Zuanon e de
2 Oliveira, 2011 (Siluriformes: Loricariidae), um peixe endêmico da bacia do
3 rio Xingu

4

5 Keila Xavier Magalhães¹, Raimundo Darley Figueiredo da Silva², André Oliveira
6 Sawakuchi³, Alany Pedrosa Gonçalves⁴, Grazielle Fernanda Evangelista Gomes², Janice
7 Muriel Fernandes Lima da Cunha⁵, Leandro Melo de Sousa^{1*}

8 ¹Laboratório de Ictiologia de Altamira, Campus Altamira, Universidade Federal do
9 Pará, Altamira, Pará, Brasil.

10 ²Laboratório de Genética Aplicada, Campus Bragança, Universidade Federal do Pará,
11 Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Bragança, Pará, Brasil.

12 ³Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

13 ⁴Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, INPA, Programa de Pós-graduação em
14 Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Manaus, AM, Brazil

15 ⁵Laboratório de Ictiologia e Biodiversidade Subterrânea da Amazônia, Campus
16 Bragança, Universidade Federal do Pará, Bragança, Pará, Brasil.

17 *Autor correspondente

18 E-mail: leandro.m.sousa@gmail.com

19 **Resumo**

20 *Baryancistrus xanthellus* é uma espécie endêmica da bacia do rio Xingu, pertencente à
21 família Loricariidae e comumente encontrada associada a ambientes com blocos
22 rochosos e em corredeiras rasas. Conhecida como acari-amarelinho possui grande
23 importância no comércio de peixes ornamentais. Entretanto, ao longo de sua
24 distribuição é possível observar diferentes padrões de pigmentação amarela em formato
25 de pontos, distribuídos ao longo do corpo dos indivíduos, levantando suspeitas em
26 relação à taxonomia da espécie. Apesar da importância comercial desta espécie, pouco
27 se sabe sobre a genética de populações de *B. xanthellus*, devido à escassez de trabalhos.
28 No presente trabalho, nós utilizamos marcadores mitocondriais e nucleares, para realizar
29 inferências sobre a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica
30 da espécie. Os resultados das análises populacionais revelaram a existência de cinco
31 haplogrupos de *B. xanthellus* distribuídas ao longo do rio. Este padrão de estruturação
32 pode estar relacionado a possíveis variações fisiográficas do rio Xingu resultantes de
33 mudanças hidrológicas ocorridas na Amazônia durante o Quaternário tardio.

34 Palavras-chaves: Estrutura populacional, Marcadores moleculares, Quaternário tardio.

35 **Introdução**

36 Conhecidos como acaris ou cascudinhos, os membros de Loricariidae
37 representam uma das maiores famílias de peixes dentro da ordem Siluriformes,
38 comportando cerca de 936 espécies organizadas em 92 gêneros e sete subfamílias [1–3].
39 São peixes emblemáticos em relação à diversidade de espécies, exibindo distintos
40 padrões de pigmentação corporal, onde a mesma espécie pode apresentar uma dezena de
41 variantes de colorido de acordo com sua área de ocorrência [4]. Encontram-se
42 amplamente distribuídos em toda a América do Sul, sendo encontrados desde o Uruguai
43 e sul da Argentina até o norte da Costa Rica [5,6].

44 A espécie *Baryancistrus xanthellus* é conhecida popularmente como acari-
45 amarelinho ou cascudo-pepita-de-ouro. O seu padrão de coloração, com presença de
46 pontos amarelos que abrangem todo o seu corpo e faixas conspícuas nas nadadeiras
47 caudal e dorsal [7], faz com que seja uma espécie muito apreciada na aquariofilia, tendo
48 assim uma grande importância comercial [8], além de ser muito usada na alimentação
49 humana ao longo de sua distribuição (L.M. SOUSA, com. pess.).

50 *Baryancistrus xanthellus* é endêmica da bacia do rio Xingu, possuindo uma
51 ampla distribuição ao longo deste rio, podendo ser encontrada desde a porção média do
52 rio Xingu, em São Félix do Xingu até Vitória do Xingu, no baixo curso da mesma bacia.
53 Essa espécie é comumente encontrada associada a ambientes com blocos e matacões de
54 rocha e em corredeiras rasas, podendo ser capturados em ambientes de até 20 metros de
55 profundidade com correnteza forte a moderada. São animais noturnos, que assim como
56 a maioria dos Loricariidae são classificados como detritívoros, alimentando-se
57 praticamente de algas e diatomáceas ([9]; L. M. SOUSA, com. pess.).

58 As várias expedições realizadas nos últimos anos ao rio Xingu possibilitaram
59 verificar e registrar uma variação nos padrões de pigmentação da espécie ao longo da

60 sua área de distribuição. Foi possível observar ao menos quatro padrões de organização
61 de pigmentação amarela em formato de pontos, distribuídos ao longo do corpo dos
62 indivíduos de *B. xanthellus*: i) Pigmentação amarela intensa em forma de pontos
63 grandes (maiores que um quarto do diâmetro ocular); ii) Pigmentação amarela intensa
64 em forma de pontos pequenos (menores que um quarto do diâmetro ocular); iii)
65 Pigmentação amarela esmaecida em forma de pontos pequenos (menores que um quarto
66 do diâmetro ocular). iv) Ausência de pigmentação amarela em formas de pontos.

67 Essa grande variação morfológica intraespecífica encontrada em *B. xanthellus*
68 pode estar relacionada a interferências do ambiente o que torna necessário o uso de
69 ferramentas filogeográficas, que faz uso de dados moleculares para entender como as
70 forças evolutivas e eventos demográficos atuaram na distribuição de linhagens e na
71 variabilidade genética de uma espécie [10,11].

72 Dados moleculares são ferramentas importantes no campo da conservação,
73 possibilitando inferências de estruturas populacionais, sistemática e delimitação de
74 táxons, especialmente para grupos de diversificação recente e com taxonomia ainda mal
75 resolvida [12,13]. O uso combinado de marcadores mitocondriais e nucleares fornecem
76 evidências mais precisas sobre a história evolutiva das espécies [11].

77 Até o momento são poucos os estudos realizados com espécies de *Baryancistrus*,
78 e há carência de estudos sobre a estrutura populacional dos táxons, do gênero, em
79 especial para *B. xanthellus*. Uma caracterização citogenética desta espécie mostrou que
80 *B. xanthellus* mantém a macroestrutura cariotípica mais comum para a tribo Ancistrini,
81 $2n=52$, além de evidenciar a posição basal de *Baryancistrus* nesta tribo [8].

82 Por ser uma espécie altamente valorizada no mercado de peixes ornamentais,
83 importante fonte de proteínas para as populações locais e ser endêmica de uma área que
84 atualmente está sofrendo impactos severos devido à implementação de projetos

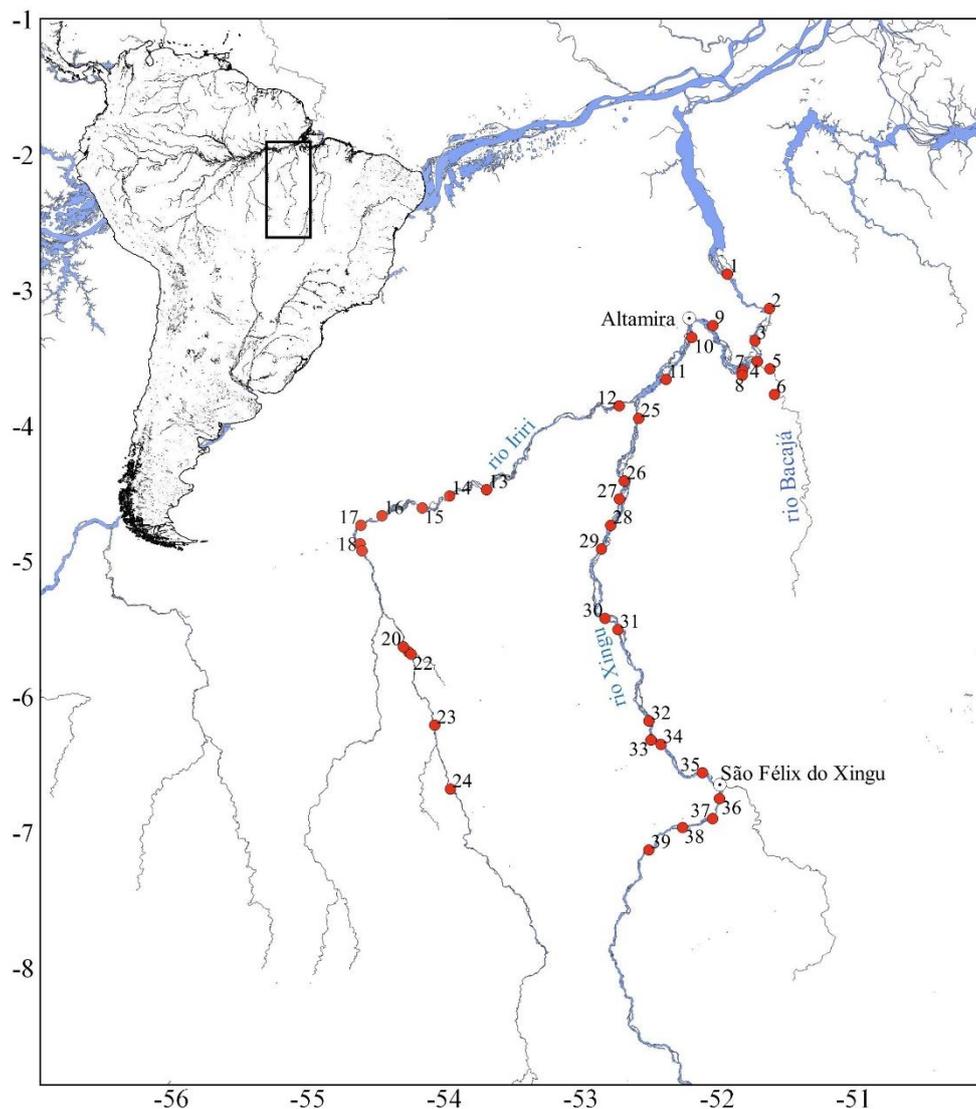
85 hidrelétricos que alteraram a dinâmica hidrológica do rio e disponibilidade de habitats, é
86 necessário que investigações sejam realizadas para conhecer com profundidade a
87 estrutura genética das populações e aspectos filogeográficos de *B. xanthellus*. Essas
88 informações poderão subsidiar planos de manejo desta espécie na bacia do Xingu e
89 orientar a criação de estratégias efetivas para a conservação da mesma.

90 Dessa forma, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar os padrões
91 filogeográficos e a estrutura populacional de *B. xanthellus* na bacia do rio Xingu/Iriri
92 (médio e baixo Xingu) a fim de avaliar a ocorrência de diferenciação genética neste
93 táxon e sua relação à evolução da paisagem geológica da bacia, utilizando marcadores
94 do genoma mitocondrial (Cyt b) e nuclear (Ribossomal Protein L3 – íntron 5 - RPL3 e
95 Prolactina – íntron 1).

96 **Material e Métodos**

97 **Área de estudo e amostragem**

98 Foram realizadas coletas em 39 localidades distribuídas ao longo do rio Xingu,
99 desde a região de São Félix do Xingu até Vitória do Xingu, sendo 24 pontos na calha
100 principal do rio Xingu, 13 pontos no rio Iriri um dos principais tributários do rio Xingu
101 e dois no rio Bacajá afluente da margem direita do rio Xingu, na região da Volta Grande
102 do rio Xingu (Fig. 1 e Tab. 1).



103 Fig. 1. Mapa dos pontos de coleta de *Baryancistrus xanthellus* ao longo do rio Xingu. 1: Vitória do
 104 Xingu; 2: Belo Monte; 3: Jericoá; 4: Percata; 5: Pariaxá; 6: Seca Farinha; 7: Ilha da fazenda; 8: Igarapé
 105 Itatá; 9: Cotovelo; 10: Gorgulho da Rita; 11: Boa Esperança; 12: Cachoeira Grande; 13:Boa Esperança
 106 (Resex); 14: Cachoeira das Minhocas; 15: Ilha do Papagaio; 16: Cachoerinha; 17: Ressaca da Califórnia;
 107 18: Lajeiro; 19: São Lucas; 20: Bené; 21: Pousada; 22: Porto Zé Carlos; 23: Zéfa; 24: Irineu; 25: Acima
 108 da Confluência; 26: Balisa; 27: Pedra Preta (Resex); 28: Estragado; 29: Morro Grande; 30: Bela Vista;
 109 31: Bom Jardim; 32: São Gonçalo; 33: Serra do Pardo; 34: Travessão do Nazaré; 35: Araraquara; 36:
 110 Remansinho; 37: Xadai; 38: Pedra Preta; 39: Onça

111 As coletas foram realizadas entre os anos de 2012 e 2016 obtendo-se um total de
 112 358 exemplares de *B. xanthellus* ao longo do rio Xingu. Todos os indivíduos foram
 113 identificados ainda em campo e confirmadas com o auxílio de literatura especializada

114 [7]. Dos exemplares capturados foram retiradas amostras do tecido muscular ou um da
 115 nadadeira pélvica, sendo em seguida acondicionadas em tubos criogênicos com álcool
 116 96%. Exemplares testemunhos foram etiquetados, fixados em formol 10%,
 117 posteriormente conservados em álcool 70% e depositados nas coleções das seguintes
 118 instituições: Laboratório de Ictiologia de Altamira, Universidade Federal do Pará (LIA),
 119 Brasil; Coleção de Peixes do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-ICT),
 120 Brasil, e na, Academy of Natural Sciences of Philadelphia (ANSP), EUA.

121 Tabela 1: Amostragem de *Baryancistrus xanthellus*, destacando as localidades de coleta, numeradas de
 122 acordo com o mapa da Figura 1.

Localidades	Nº de amostras
1 Vitória do Xingu (XVX)	1
2 Belo Monte (XBM)	37
3 Jericoá (XJC)	22
4 Percata (BPT)	1
5 Pariaxá (BPX)	13
6 Seca Farinha (BSF)	10
7 Ilha da fazenda (XIF)	30
8 Igarapé Itatá (XII)	4
9 Cotovelo (XCT)	23
10 Gorgulho da Rita (XGR)	8
11 Boa Esperança (XBE)	14
12 Cachoeira Grande (ICG)	25
13 Boa Esperança/Iriri (IBE)	1
14 Cachoeira das Minhocas (ICL)	4
15 Ilha do Papagaio (IIP)	5
16 Cachoeirinha (ICA)	5
17 Ressaca da Califórnia (IRC)	1
18 Lajeiro (ILJ)	10
19 São Lucas (ISL)	4
20 Bené (IBN)	6
21 Pousada (IPD)	1
22 Porto Zé Carlos (IPC)	8
23 Zefá (IZF)	6
24 Irineu (IIU)	1
25 Acima da confluência (XCC)	5
26 Balisa (XBL)	2
27 Pedra Preta/Resex (XRP)	8
28 Estragado (XED)	5
29 Morro Grande (XMG)	1

123 Tabela 1 (Continuação): Amostragem de *Baryancistrus xanthellus*, destacando as localidades de coleta,
 124 numeradas de acordo com o mapa da Figura 1.

Localidades	Nº de amostras
30 Bela Vista (XBV)	2
31 Bom Jardim (XBJ)	2
32 São Gonçalo (XSG)	5
33 Serra do Pardo (XSP)	5
34 Travessão do Nazaré (XTZ)	2
35 Araraquara (XAR)	16
36 Remansinho (XRE)	5
37 Xadai (XXA)	15
38 Pedra Preta (XPP)	15
39 Onça (XON)	30
TOTAL	358

Obs.: Nas siglas, "X" indica localidades no rio Xingu, "I" rio Iriri e "B" rio Bacajá.

125 Procedimentos laboratoriais

126 Isolamento do Material Genético e Regiões Genômicas

127 O DNA total foi obtido utilizando-se o kit comercial *Wizard Genomic-*
 128 *PROMEGA*, seguindo instruções do fabricante. A qualidade do material genético de
 129 cada amostra foi avaliada em Eletroforese horizontal, onde uma mistura de 2 µL de
 130 DNA e 2 µL Gel RedTM (BIOTIUM) foi aplicadaa em gel de agarose (1%) e submetida
 131 a 60 Volts por 30 minutos. Após a realização da eletroforese, as amostras foram
 132 visualizadas em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentadas.

133 Para o presente estudo foram utilizados fragmentos de três regiões genômicas
 134 (mitocondrial - gene codificador da Cytocromo b (Cyt b); nucleares - íntrons dos genes
 135 - Proteína Ribossomal L3 (RPL3) e Prolactina (PrI)) (Tabela 2), amplificadas por meio
 136 da Reação de Cadeia da Polimerase (PCR). As reações ocorreram com um volume final
 137 de 15µL, sendo 2,4 µL de DNTP (1,25 mM), 1,5 µL de tampão (*Buffer*) (10x), 0,6 µL
 138 de MgCl² (50 mM), 0,6 µL de cada iniciador (50 ng/µL), 0,6 µL de DNA total
 139 (aproximadamente 100 ng), 0,1 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água purificada

140 para completar o volume final da reação. As temperaturas de hibridização empregadas
 141 para os marcadores estão listadas na Tabela 2, juntamente com a especificação dos
 142 iniciadores utilizados.

143 Sequenciamento

144 As PCRs positivas foram purificadas com PEG (Polietileno Glicol) de acordo
 145 com o protocolo descrito por Paithankar e Prasad [14] e em seguida foram submetidas à
 146 reação de sequenciamento utilizando o método didesoxi terminal, proposto por Sanger
 147 et al. [15], com os reagentes do *kit Big Dye (ABI PrismTMDyeTerminator*
 148 *CycleSequencing.ReadingReaction-Life Techlogies)*, sendo o produto precipitado
 149 submetido à eletroforese capilar no sequenciador automático ABI 3500 (*Applied*
 150 *Biosystems*).

151

152 Tabela 2. Sequências dos Iniciadores que foram utilizados no presente estudo com o respectivo marcador
 153 que foi isolado.

Marcador	Iniciadores	Sequência- 5'- 3'	Referência	Hibridização
Cyt b	FishCytbF	ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC	[16]	55°
	TrucCytbR	CCGACTTCCGGATTACAAGACCG		
RPL 3	RPL35F	AAGAAGTCYCACCTCATGGAGAT	[17]	54°
	RPL36R	TTRCGKGGCAGTTTCTTTGTGTGCCA		
Prl	Prl1F	GACAARCTKCACTCBCTCAGCCA	[18]	64°
	Prl1R	TGNAGDGAGGABGTGTGRCAC		

154

155 Preparação dos bancos de dados

156 As sequências foram editadas manualmente, quando necessário, utilizando o
 157 programa BioEdit [19], sendo alinhadas de modo automático usando o método
 158 CLUSTALW [20] implementado no BioEdit [19]. Para os marcadores nucleares, as
 159 fases gaméticas dos indivíduos foram definidas empregando o algoritmo Phase v.2.0
 160 [21] implementado no DNAsp v.5.10 [22]. Foi utilizado o software SeqPhase para

161 converter os arquivos de saída do Phase [23]. Somente os haplótipos que retornaram
162 com uma probabilidade maior que 0,6 foram utilizados nas análises subsequentes. A
163 existência de eventos de recombinação foi estimada por meio do teste Phil [24],
164 disponível no SplitsTree v.4.14.4 [25].

165 A caracterização dos haplótipos (identificação do número e frequência nas
166 populações), foi realizada no programa DNAsp v.5.10 [22], onde também foi gerado o
167 arquivo com formato de entrada para o programa Arlequin [26].

168 **Análises Populacionais e Filogeográficas**

169 Para cada marcador estudado foram calculados parâmetros descritivos para
170 caracterização dos níveis de diversidade genética, como o número de sítios
171 polimórficos, diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h), para isso foi utilizado o
172 programa Arlequin v.3.5.1.2 [26]. Para verificar a relação espacial e genealógica dos
173 haplótipos foi construída uma rede de haplótipos no programa HAPLOVIEWER [27]
174 que foi obtida para cada marcador e conduzida com base em uma árvore de Máxima
175 Verossimilhança obtida no pacote PhyML [28].

176 A estruturação populacional de *B. xanthellus*, foi verificada utilizando a Análise
177 Bayesiana de Estruturação Populacional (*Bayesian Analysis of Population Structure*),
178 implementada no programa BAPS6 [29]. Nesta análise, o número de agrupamentos é
179 definido usando um algoritmo Bayesiano que estima a distribuição das frequências
180 alélicas de todas as populações em teste [30].

181 A análise de variância molecular (AMOVA) [31] e o índice de fixação par a par
182 (F_{ST}) [32] foram usados para avaliar o fluxo gênico entre as localidades amostradas e
183 desta forma, inferir o padrão de estruturação das populações de *B. xanthellus* ao longo
184 do rio Xingu. Essas análises foram efetuadas no Arlequin v.3.5.1.2 [26].

185 Uma representação geográfica da distribuição e frequência dos haplótipos foi
186 conduzida no programa Gengis v2.2.0. [33].

187 Para testar possíveis desvios da neutralidade, podendo assim apontar processos
188 evolutivos que estejam ocorrendo nas populações de *B. xanthellus*, foram calculadas as
189 estatísticas F_s [34] e D [35]. Estas análises foram conduzidas no Arlequin v.3.5.1.2
190 [26], com uma significância de 10.000 permutações.

191 A história demográfica da espécie *B. xanthellus* foi inferida por meio do método
192 de *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP), implementado no programa BEAST v.1.8
193 [36]. Foi empregado o relógio estrito, utilizando uma taxa de mutação de 0,76 % dentro
194 de linhagens/milhões de ano, como sugerido por Zardoya & Doadrio [37] para o
195 Cytocromo b, utilizando o modelo evolutivo sugerido pelo Kakusan v.4 [38].

196 A análise de EBSP foi baseada em 100 milhões de gerações, sendo que uma
197 genealogia foi amostrada a cada 10.000 passos. A qualidade dos resultados foi
198 visualizada no Tracer v.1.6 (Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>), pela
199 análise de ESS (Effective Sample Size). Todos os valores de ESS permaneceram acima
200 de 200.

201 **Resultados**

202 **Caracterização dos Bancos e Níveis de Diversidade Genética**

203 Análises preliminares utilizando o BAPS sugeriram cinco agrupamentos de *B.*
204 *xanthellus* (A, B, C, D e E), dentro da sua área de distribuição. Esses agrupamentos
205 foram usados nas análises subsequentes.

206 Obteve-se um fragmento de 717 pb do gene Cyt b para os 358 indivíduos, onde
207 observou-se 135 haplótipos e 169 sítios polimórficos. O haplótipo mais comum foi o
208 H41 compartilhado por 69 indivíduos do agrupamento C, seguido do H4 compartilhado

209 por 19, exclusivo do agrupamento A. Na maioria dos casos os haplótipos foram únicos,
210 aproximadamente 69%.

211 Para as regiões autossômicas por meio do teste de Phiw não foram observados
212 eventos de recombinação, obtendo valores não significativos para ambos os íntrons:
213 RPL3 ($p = 0.9059$) e Prolactina ($p = 0.1623$).

214 Após a determinação das fases gaméticas, para o íntron RPL3 obteve-se 225 pb
215 em 221 indivíduos, representando 60 haplótipos. Desses, 123 compartilharam o H1,
216 seguido do H4 compartilhado por 42 indivíduos. Já para o íntron prolactina obteve-se
217 479 pb distribuídos em 203 haplótipos para os 224 indivíduos sequenciados, sendo os
218 haplótipos mais comuns o H1 e H5 compartilhado por 59 e 32 indivíduos,
219 respectivamente (Tabela 3).

220 Em relação aos níveis de variação genética para os cinco agrupamentos,
221 analisando o marcador mitocondrial Cyt b, foram encontrados valores de diversidade
222 haplotípica (h) que variaram entre 0.944 ± 0.012 (D) e 0.275 ± 0.148 (E), já os valores de
223 diversidade nucleotídica (π) permaneceram entre 0.0023 ± 0.0016 (B) e 0.0076 ± 0.0041
224 (D). Observando as regiões nucleares, para o íntron RPL3 os índices de diversidade
225 haplotípica e nucleotídica variaram entre $h = 0.809 \pm 0.023$ (A) e 0.244 ± 0.052 (D); $\pi =$
226 0.0061 ± 0.0042 (A) e 0.0014 ± 0.0016 (D). Já para o íntron Prolactina variou entre $h =$
227 0.971 ± 0.006 (C) e 0.894 ± 0.078 (E); $\pi = 0.0075 \pm 0.0043$ (B) e 0.0048 ± 0.0030 (D)
228 (Tabela 3).

229 Tabela 3: Valores dos índices de diversidade genética e estatísticas de neutralidade F_s e D , para *B.*
 230 *xanthellus*, calculados de acordo com os agrupamentos identificados no BAPS. Número de indivíduos
 231 (N), número de haplótipos (Nh), sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π).

Populações	N	Nh	S	$h \pm dp$	$\pi \pm dp$	Tajima (D)	Fu (FS)
Cyt b							
A	71	26	28	0.891 +/- 0.025	0.0033 +/- 0.0020	-1,875*	-20,025**
B	21	12	14	0.910 +/- 0.048	0.0023 +/- 0.0016	-2,059**	-8,681**
C	159	57	67	0.806 +/- 0.033	0.0027 +/- 0.0017	-2,585**	-27,356**
D	92	37	45	0.944 +/- 0.012	0.0076 +/- 0.0041	-1,219	-18,205**
E	15	3	15	0.275 +/- 0.148	0.0030 +/- 0.0020	-2,225**	2,795
RPL3							
A	106	12	9	0.809 +/- 0.023	0.0061 +/- 0.0042	-0,513	-4,171*
B	42	8	7	0.453 +/- 0.094	0.0031 +/- 0.0027	-1,563*	-4,922*
C	162	25	17	0.799 +/- 0.026	0.0059 +/- 0.0041	-1,484*	-21,532**
D	122	11	6	0.244 +/- 0.052	0.0014 +/- 0.0016	-1,571*	-13,493**
E	10	4	4	0.533 +/- 0.180	0.0054 +/- 0.0043	-0,521	-0,459
PRL							
A	100	57	40	0.966 +/- 0.009	0.0071 +/- 0.0041	-1,701*	-26,219**
B	42	23	22	0.962 +/- 0.013	0.0075 +/- 0.0043	-0,986	-14,194**
C	170	84	34	0.971 +/- 0.006	0.0053 +/- 0.0032	-1,675*	-26,839**
D	124	31	18	0.930 +/- 0.010	0.0048 +/- 0.0030	-0,847	-23,352**
E	12	8	9	0.894 +/- 0.078	0.0060 +/- 0.0038	-0,118	-2,683

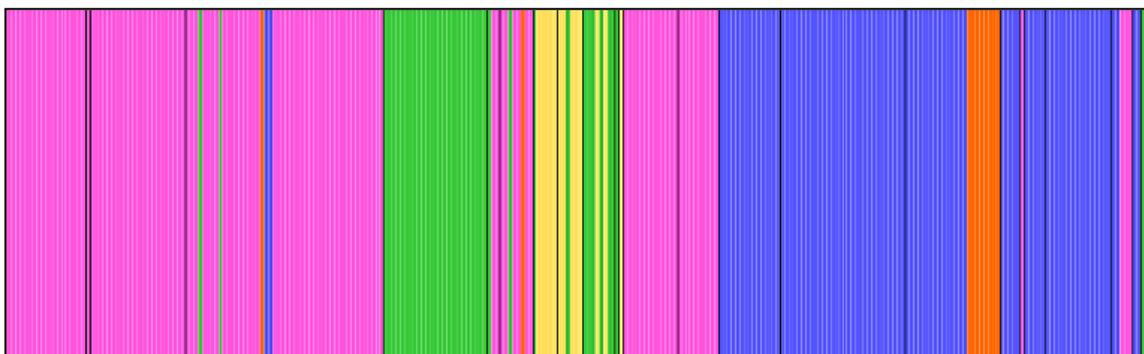
232 ** $P < 0.01$. * $P < 0.05$.

233 O número amostral (N) para os íntrons estão duplicados devido os heterozigotos.

234 Estrutura genética populacional

235 O BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure) revelou cinco grupos de *B.*
 236 *xanthellus* para o marcador mitocondrial Cyt b (logML= -3688,8922; probabilidade= 1)
 237 (Figura 2). O primeiro grupo, chamado de Resex do rio Iriri (A) contém 71 indivíduos
 238 das localidades: Boa Esperança, Gorgulho da Rita (no rio Xingu, abaixo da sua
 239 confluência com o rio Iriri), Cachoeira Grande, Zéfa, Bené, Porto Zé Carlos, Pousada,
 240 acima da confluência, Lajeiro, São Lucas, Cachoeirinha, Ressaca da Califórnia, ilha do
 241 Papagaio, Cachoeira das Minhocas e Boa Esperança (Iriri) (rio Iriri, acima da
 242 confluência). O segundo grupo Resex do rio Xingu (B) abrange 21 indivíduos
 243 distribuídos nos pontos de Belo Monte, Gorgulho da Rita, Balisa, Pedra Preta (Resex),

244 Estragado, Morro Grande, Bela Vista e Bom Jardim. Um terceiro grupo (C) comporta o
 245 maior número de indivíduos (159), da região conhecida como Volta Grande do Xingu
 246 incluindo as localidades no rio Bacajá, distribuídos nos pontos de Vitória do Xingu,
 247 Belo Monte, Pariaxá, Percata, Seca Farinha, Ilha da Fazenda, Jericoá, Igarapé Itatá,
 248 Cotovelo, Gorgulho da Rita, Boa Esperança. O quarto grupo (D) inclui 92 indivíduos da
 249 região de montante do rio Xingu, São Felix do Xingu, abrangendo as localidades do São
 250 Gonçalo, Serra do Pardo, Travessão do Nazaré, Araraquara, Remansinho, Xadai, Pedra
 251 Preta, Onça e Bom Jardim. O quinto grupo (E) que está localizado na região da Estação
 252 Ecológica da Terra do Meio no rio Iriri apresenta o menor número de indivíduos (15),
 253 presentes nas localidades conhecidas como Bené, Porto Zé Carlos, Zéfa e Irineu, (Fig.
 254 2).



255 Fig. 2: Estimativa do número de agrupamentos de *B. xanthellus* ao longo do rio Xingu com base na
 256 análise bayesiana realizada no programa BAPS. Os cinco grupos foram indicados pelas cores Verde
 257 (Grupo A), Laranja (Grupo B), Rosa (Grupo C), Azul (Grupo D) e Amarelo (Grupo E).

258

259 O resultado da AMOVA indicou que a maior parte da diferenciação para o
 260 marcador Cyt b ocorre entre estas cinco populações (81.64 %), em vez de dentro delas
 261 (18.36%) (ϕ_{ST} = 0.816) (Tabela 4). O resultado do F_{ST} para comparação entre todas as
 262 localidades (Fig. 3) e também para os grupos (Tabela 5), corroborou com este cenário,
 263 apresentando valores elevados e altamente significativos para todas as comparações,

264 podendo-se notar no gráfico do marcador Cyt b para todos os pontos amostrados a
 265 presença dos cinco grupos.

266 Tabela 4: Análise de Variância Molecular (Amova) estimada para avaliar a diferença entre e dentro das
 267 cinco populações de *B. xanthellus* apontadas pelo resultado do BAPS.

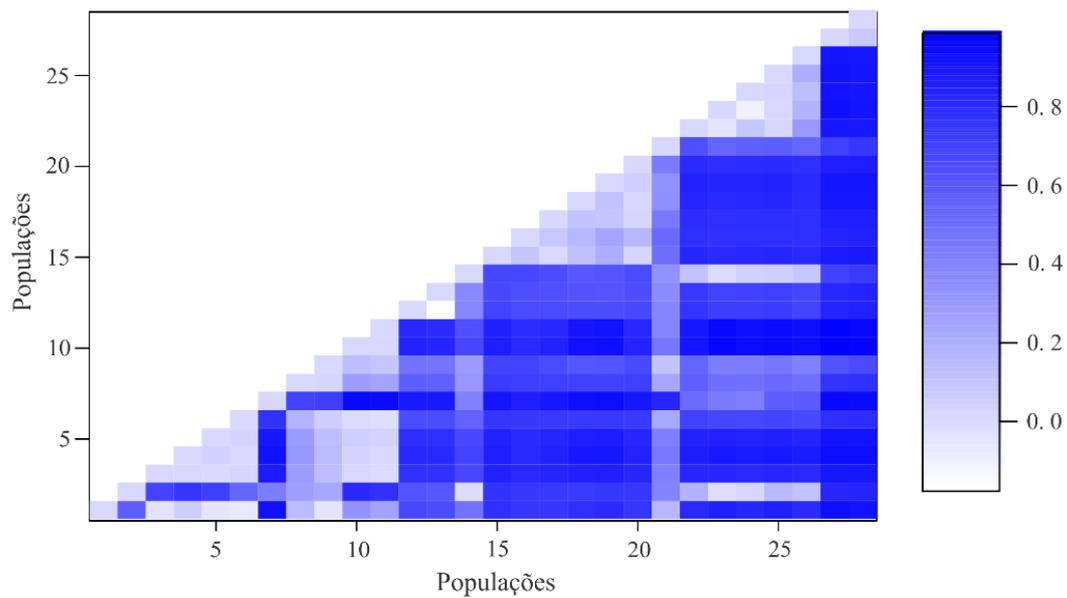
Fonte de variação	Componente de Variância	Variância %	Estatística ϕ
Cyt b			
Entre Populações	6.50929 Va	81.64	$\phi_{ST} = 0.816^*$
Dentro de Populações	1.46341 Vb	18.36	
RPL3			
Entre Populações	0.05293 Va	9.62	$\phi_{ST} = 0.096^*$
Dentro de Populações	0.49746 Vb	90.38	
PRL			
Entre Populações	0.20710 Va	12.14	$\phi_{ST} = 0.12^*$
Dentro de Populações	1.49900 Vb	87.86	

268 Os valores significativos ($P < 0,01$) estão destacados asterisco

269 Tabela 5: Estimativas do Índice de Fixação (F_{ST}) par-a-par entre as cinco populações de *B. xanthellus*
 270 distribuídas ao longo do rio Xingu.

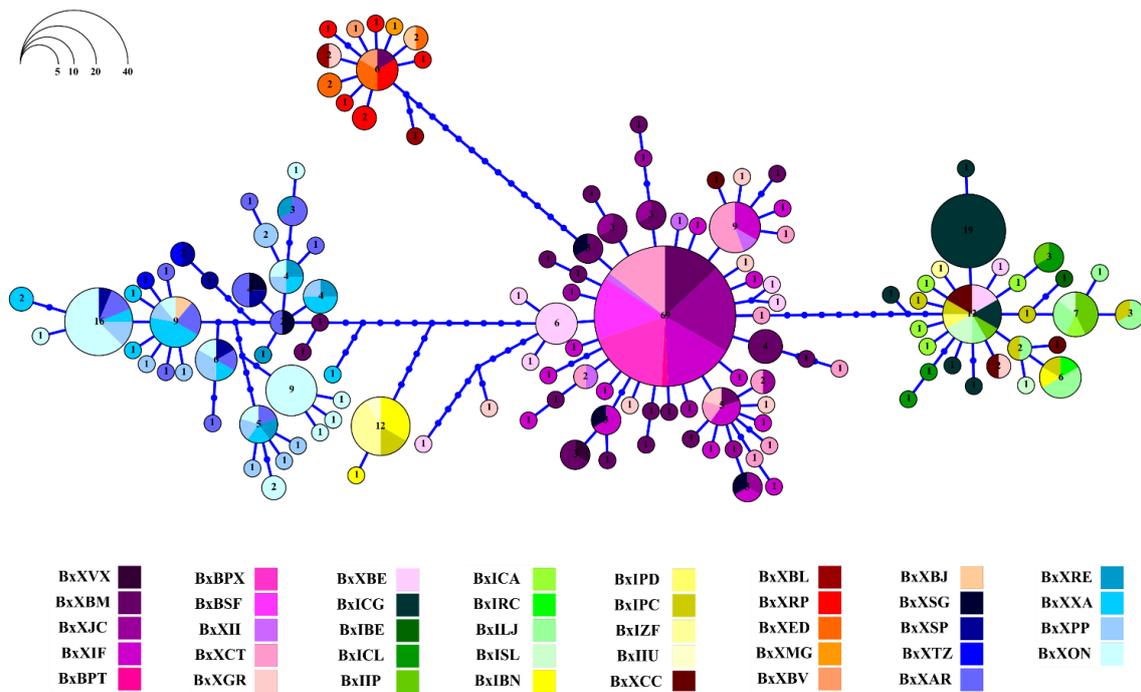
Cyt b	A	B	C	D	E
A	-				
B	0.87564*	-			
C	0.80954*	0.88426*	-		
D	0.79873*	0.82177*	0.80393*	-	
E	0.87165*	0.91604*	0.84973*	0.65659*	-
RPL3					
A	-				
B	0.07146*	-			
C	0.08864*	0.03844*	-		
D	0.15358*	0.02008	0.11811*	-	
E	-0.00899	0.03766	0.03896	0.21359*	-
PRL					
A	-				
B	0.13620*	-			
C	0.04134*	0.06452*	-		
D	0.24421*	0.05564*	0.14433*	-	
E	-0.01509	0.11282*	0.00860	0.27834*	-

271 Os valores significativos ($P < 0,01$) de F_{ST} estão destacados asterisco.



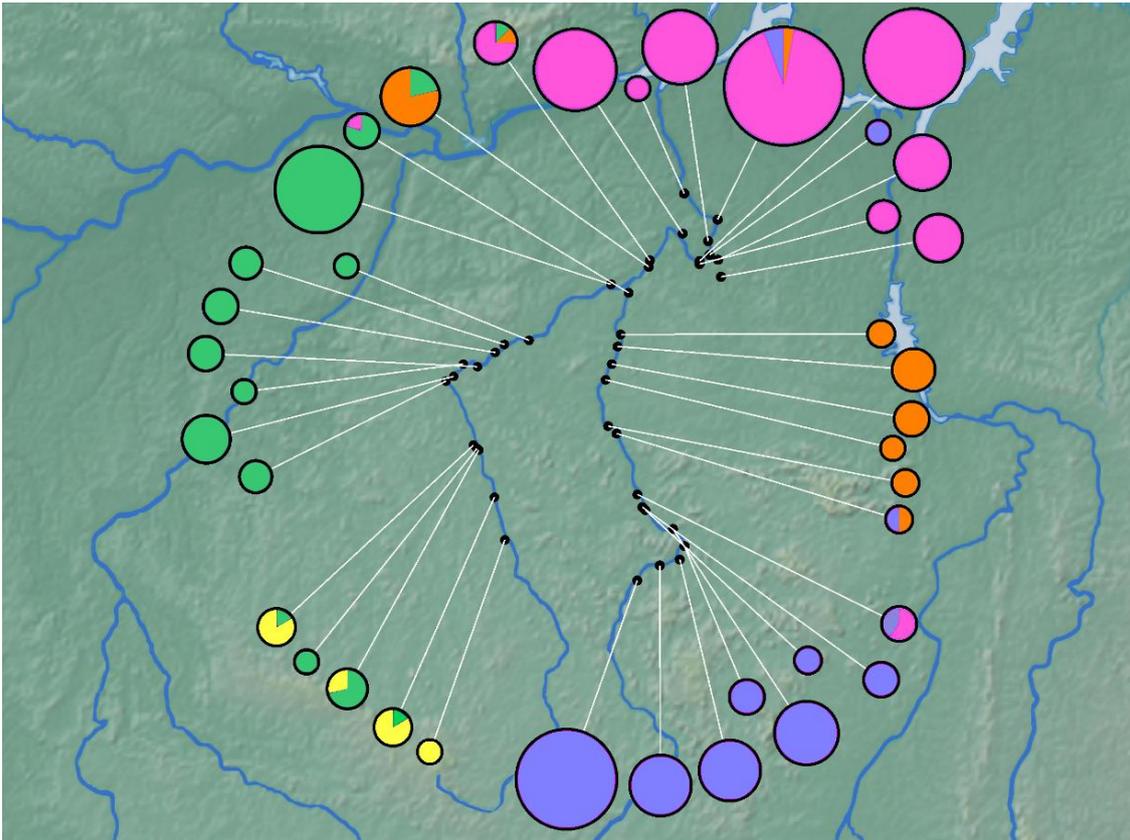
272 Fig. 3: Índice de Fixação (*F_{ST}*) para o marcador mitocondrial Cyt b para todos os pontos de amostragem
 273 de *B. xanthellus*. Os valores da comparação par-a-par encontram-se coloridos de acordo com a escala de
 274 correlação apresentada à esquerda.

275 Os indícios de subestruturarão para populações de *B. xanthellus* distribuídas ao
 276 longo do rio Xingu também foram corroborados pela distribuição dos haplótipos na rede
 277 utilizando o Cyt b, onde foi possível visualizar a presença desses cinco grupos. Um
 278 grupo compreende à maior parte dos representantes da região da Volta Grande do
 279 Xingu. Os outros grupos separam respectivamente indivíduos da região de São Félix do
 280 Xingu, da Resex do Xingu, Resex do Iriri e da Estação Ecológica do Xingu,
 281 apresentando populações bem subestruturadas ao longo destes trechos do rio Xingu e
 282 Iriri. No entanto ainda é possível perceber o compartilhamento de haplótipos entre
 283 alguns desses grupos (Fig. 4).



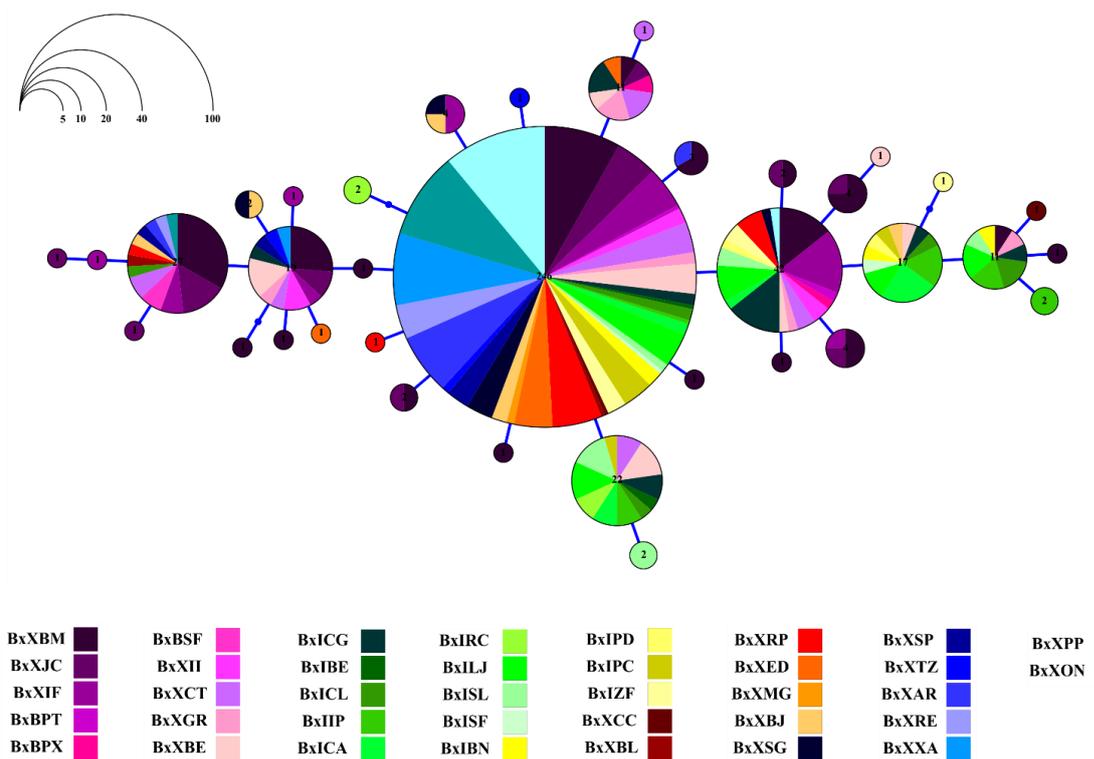
284 Fig. 4: Rede haplotípica que representa a distribuição dos 134 haplótipos de *B. xanthellus* para o
 285 marcador mitocondrial Cyt b. As cores abaixo da rede representam os 39 pontos amostrados nesse estudo.
 286 Tons em roxo representam o grupo da Volta Grande do Xingu (C); verde: Resex do rio Iriri (A); azul: São
 287 Félix do Xingu (D); vermelho: Resex do rio Xingu (B); amarelo: Estação Ecológica da Terra do Meio
 288 (E).

289 Na visualização dos haplótipos distribuídos no mapa foi possível verificar que
 290 ainda existe compartilhamento de haplótipos entre algumas dessas populações,
 291 podendo-se notar que no grupo da Volta Grande (C) é possível ver a presença de
 292 haplótipos de indivíduos da população de São Félix do Xingu (D) (Fig. 5).

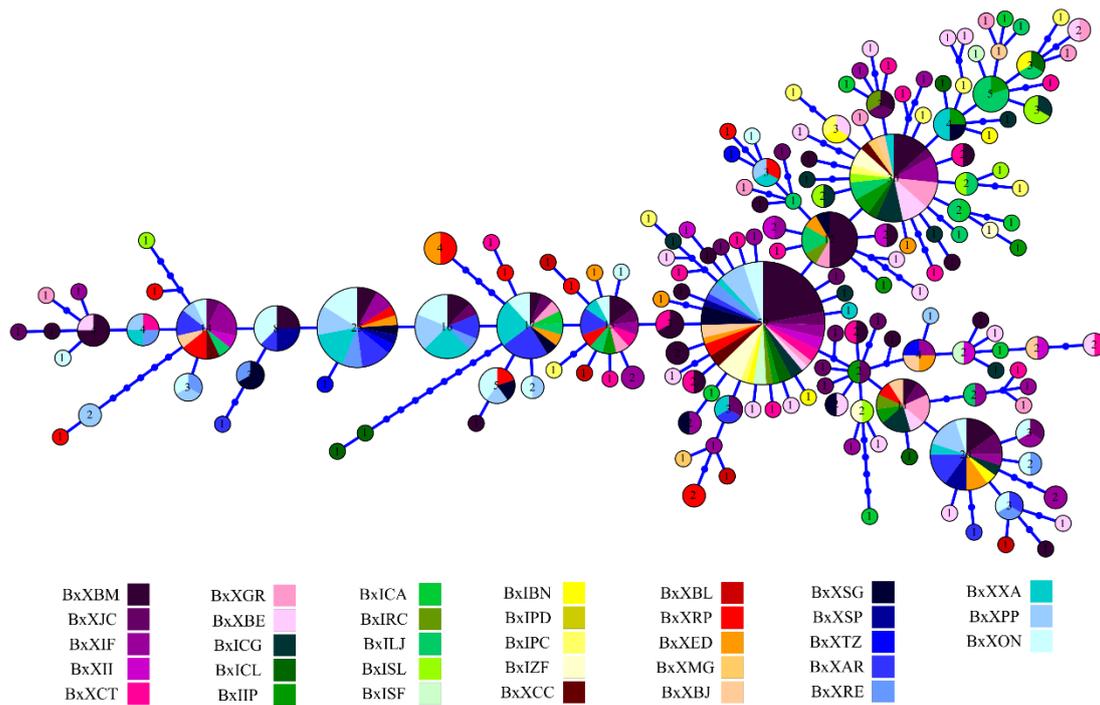


293 Fig. 5: Distribuição dos haplótipos no mapa de distribuição de *B. xanthellus*, cada cor representa uma
 294 linhagem, Verde: Grupo A; Laranja: Grupo B; Rosa: Grupo C; Azul: Grupo D; Amarelo: Grupo E.
 295

296 Este cenário de subestruturação genética não foi observado para as regiões
 297 nucleares. Tanto para o RPL3 quanto para a Prolactina, a AMOVA apontou que a maior
 298 parte da diferenciação está dentro dos cinco grupos ao invés de entre eles (90.38 % e
 299 87.86%) (Tabela 4), sendo este resultado bastante similar com obtido no F_{st} (Tabela 5).
 300 A ausência de sub-estruturação genética para as regiões nucleares também foi observada
 301 nas redes de haplótipos, não sendo possível observar uma correspondência geográfica
 302 para a distribuição dos haplótipos (Fig. 6 e 7).



303 Fig. 6: Rede haplotípica representando a distribuição dos 60 haplótipos de *B. xanthellus* para o marcador
 304 nuclear RPL3. As cores abaixo da rede representam os pontos amostrados nesse estudo. Tons em roxo
 305 representam o grupo da Volta Grande do Xingu (C); verde: Resex do rio Iriri (A); azul: São Félix do
 306 Xingu (D); vermelho: Resex do rio Xingu (B); amarelo: Estação Ecológica da Terra do Meio (E).

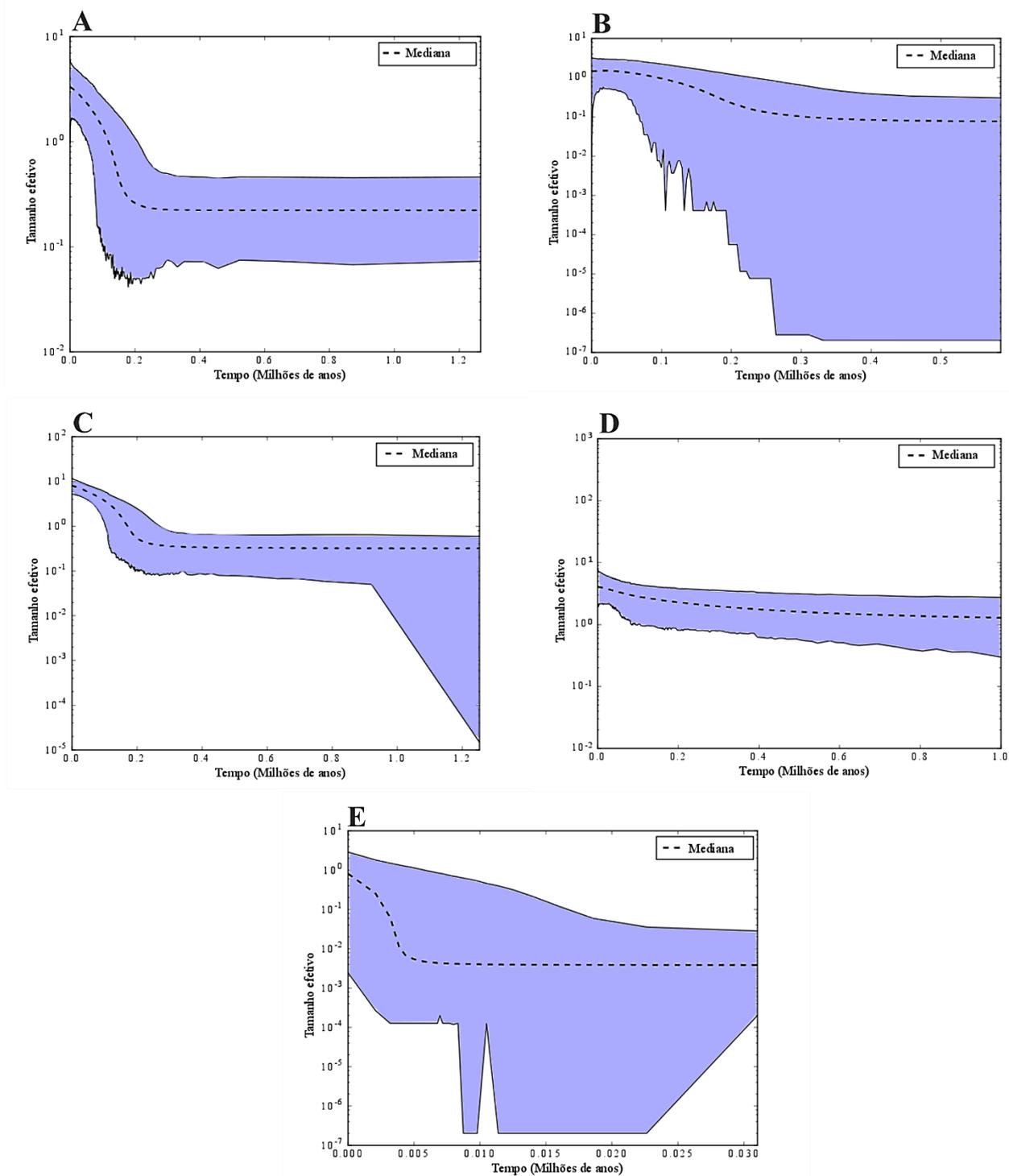


307 Fig. 7: Rede haplotípica representando a distribuição dos 156 haplótipos de *B. xanthellus* para o marcador
 308 nuclear PRL. As cores abaixo da rede representam os pontos amostrados nesse estudo. Tons em roxo
 309 representam o grupo da Volta Grande do Xingu (C); verde: Resex do rio Iriri (A); azul: São Félix do
 310 Xingu (D); vermelho: Resex do rio Xingu (B); amarelo: Estação Ecológica da Terra do Meio (E).

311 Neutralidade e História demográfica

312 Para as estatísticas F_s e D foram verificados valores negativos e significantes
 313 para o marcador mitocondrial e também para os marcadores nucleares, para quase todos
 314 os cinco agrupamentos de *B. xanthellus* analisados (Tabela 3).

315 Foi inferido por meio de *Extended Bayesian Skyline Plot* a história demográfica
 316 para cada um dos grupos (A, B, C, D e E) resultantes das demais análises. Nos gráficos
 317 das populações A e C, é possível verificar uma expansão populacional que teve início
 318 por volta de 200 mil anos atrás. Já para os grupos B e D, percebe-se uma estabilidade no
 319 tamanho efetivo populacional (N_e) para a população, enquanto que para o grupo E
 320 observa-se um aparente aumento no tamanho populacional datado em aproximadamente
 321 5 mil anos (Fig. 8).



322 Fig. 8: Bayesian Skyline Plot para as cinco linhagens de *Baryancistrus xanthellus* distribuídas ao longo
 323 do Xingu (A, B, C, D e E). As curvas correspondem a todos os marcadores concatenados. O eixo y
 324 corresponde ao tamanho efetivo populacional (N_e) e o eixo x ao tempo médio em milhões de anos.

325 **Discussão**

326 O presente estudo é a primeira caracterização dos padrões filogeográficos da
327 espécie *B. xanthellus*, sendo este também o primeiro estudo sobre estruturação
328 populacional para o grupo *Baryancistrus*, com base de dados robusta, sustentada por
329 sequências de 358 indivíduos da espécie *B. xanthellus*, incluindo marcadores
330 mitocondriais e nucleares, que permitiu identificar cinco haplogrupos ao longo do rio
331 Xingu, com base no padrão evolutivo do marcador mitocondrial Cyt b.

332 Os padrões filogeográficos observados são discutidos em termos de possíveis
333 variações fisiográficas do rio Xingu resultantes de mudanças hidrológicas ocorridas na
334 Amazônia durante o Quaternário tardio [39].

335 **Diversidade Genética**

336 Foram verificados valores elevados de diversidade haplotípica (h) e valores
337 reduzidos de diversidade nucleotídica (π) para o marcador mitocondrial Cyt b na
338 maioria dos agrupamentos analisados neste estudo. Para os grupos Resex do rio Iriri,
339 Resex do rio Xingu e Volta grande, foram observados valores elevados de h associada a
340 valores reduzidos de π . Baixos valores de diversidade nucleotídica associados a altos
341 valores de diversidade haplotípica é uma característica de eventos de gargalo
342 populacional seguido de expansão populacional, resultando na acumulação mutações
343 novas [40,41]. Padrão similar já foi reportado para um outro membro da família
344 Loricariidae, *Hypostomus ancistroides* [42] e também para outras famílias da ordem
345 Siluriformes [43–45], estando sempre relacionado a eventos de expansão populacional
346 das espécies.

347 Um padrão diferente foi observado para o grupo de São Félix do Xingu, no qual
348 foi verificada uma combinação de altos valores de h e π , típico de populações grandes e
349 estáveis com uma longa história evolutiva [41]. Já para o grupo da Estação Ecológica da

350 Terra do Meio, foram gerados baixos valores de h e π , o que pode estar associado ao
351 número reduzido de indivíduos coletados nesta região, assim como encontrado para
352 uma das linhagens de uma espécie da família Aridae (Siluriformes), *Bagre bagre* [46].

353 Um menor valor de diversidade haplotípica, quando comparado com os demais
354 grupos, foi encontrado para o grupo da Volta Grande do Xingu. Este resultado pode
355 estar relacionado à pesca excessiva de indivíduos nesta região, devido à proximidade da
356 cidade de Altamira de onde se iniciou a pesca para exportação ao mercado aquarífilista
357 no final da década de 1970, tornando-se mais acessível a coleta dos indivíduos de *B.*
358 *xanthellus* na região. A pesca especializada por mergulhos nas corredeiras se
359 desenvolveu e se concentrou na região da Volta Grande, não se deslocando para outros
360 locais mais distantes, como São Félix do Xingu. Além disso, o trecho da Volta Grande
361 abriga a maior variação de coloração da espécie, tornando assim a pesca destes
362 indivíduos mais intensa nessa região ao longo destes 40 anos. Isso pode também estar
363 relacionado à baixa diversidade genética, onde este grupo apresentou o maior número
364 de indivíduos compartilhando o mesmo haplótipo, indicando possivelmente ocorrência
365 de gargalo populacional nesta população.

366 Com os impactos causados pela Usina hidrelétrica de Belo Monte, que começou
367 operar no primeiro semestre de 2016, essa perda de diversidade pode aumentar em
368 escala temporal e espacial, uma vez que essa população de *B. xanthellus*, da Volta
369 Grande do Xingu será atingida diretamente pela perda de hábitat e diminuição na
370 disponibilidade de alimento, principalmente devido ao recobrimento de substratos
371 rochosos por sedimentos e redução e fragmentação dos hábitats de corredeiras [47,48].
372 A mudança de um ambiente lótico para lântico pode reduzir drasticamente populações
373 de peixes reolíficos devido à perda de hábitats, mudança na qualidade da água e
374 velocidade da corrente, chegando até a erradicar as mesmas [49,50].

375 No rio Xingu, já existem casos de espécies endêmicas de Loricariidae que estão
376 ameaçadas de extinção devido à pressão da pesca, como o caso da espécie *Hypancistrus*
377 *zebra*, um peixe de grande valor comercial que é muito apreciado no comércio de peixes
378 ornamentais que atualmente encontra-se na lista do Ministério do Meio Ambiente como
379 espécie criticamente ameaçada [51].

380 **Estrutura Populacional e Filogeografia**

381 Os resultados de estruturação populacional para o Cyt b evidenciaram a presença
382 de cinco haplogrupos de *B. xanthellus* distribuídos ao longo do rio Xingu. Nessas
383 populações foi possível observar uma maior variação intraespecífica. Isto evidencia a
384 forte subestruturação destas populações.

385 O rio Xingu apresenta uma enorme variedade de ambientes aquáticos, pois
386 alterna setores dominados por substratos rochosos e corredeiras, com setores com
387 substratos formados por sedimentos e remansos [52]. Também destaca-se por apresentar
388 setores com canais múltiplos de conexão restrita, grande variação de profundidade e
389 desníveis abruptos que formam cachoeiras. Esta diversidade geomorfológica confere
390 alta variedade de habitats aquáticos no rio Xingu, tanto nos setores de substrato rochoso
391 quanto nos setores com acúmulo de sedimentos.

392 *Baryancistrus xanthellus* é uma espécie altamente adaptada aos ambientes de
393 corredeiras, além de ser um peixe territorialista como a maioria dos Loricarídeos, não
394 realizando grandes migrações para a reprodução. Estas características podem restringir
395 o fluxo gênico entre populações ao longo do rio [53]. Ao longo da distribuição dos
396 cinco haplogrupos encontrados neste estudo, é possível verificar a presença de grandes
397 áreas de remansos em zonas com canal mais profundo e áreas com acúmulo de
398 sedimentos arenosos, que fragmentam os habitats de corredeiras e substratos rochosos e
399 que poderiam limitar o deslocamento destas populações para as outras localidades.

400 Assim, este isolamento dos trechos de corredeiras por zonas de remanso e/ou substrato
401 arenoso aliado às características biológicas da espécie poderiam estar exercendo grande
402 influência no cenário de diferenciação genética observada entre as populações de *B.*
403 *xanthellus*.

404 Na rede de haplótipos e na representação geográfica dos mesmos para o
405 marcador Cyt b é possível observar o compartilhamento de haplótipos entre algumas
406 populações. Esse fato pode estar relacionado à dinâmica hidrológica do rio, que em
407 épocas de cheia sazonal ampliam o leito do rio e criam canais que podem permitir
408 algum fluxo gênico [53]. A conexão temporária e sazonal entre setores isolados de
409 corredeiras também pode ocorrer durante períodos de maior precipitação na bacia do
410 Xingu enquanto que fases de menor precipitação favoreceriam acúmulo de sedimentos e
411 fragmentação e redução dos habitats de corredeiras.

412 Em relação a paisagem geológica, a região leste da Amazônia, onde insere-se a
413 bacia do Xingu, passou por grandes variações de precipitação durante o Quaternário
414 tardio [39,54]. Durante o último máximo glacial há aproximadamente 21.000 anos, a
415 precipitação no leste da Amazônia teria sido reduzida e representaria 58% da
416 precipitação atual enquanto que a precipitação no Holoceno médio (6.000 anos atrás)
417 seria elevada e equivaleria a 142% da precipitação atual [54]. Eventos climáticos
418 abruptos, tal como o *Heinrich Stadial 1* (HS1) entre 18.000 e 15.000 anos atrás,
419 provocaram aumento abrupto na precipitação da Amazônia [55].

420 Estes extremos hidrológicos milenares podem ter resultado em alterações
421 significativas na fisiografia do rio Xingu. Períodos de maior precipitação, tais como
422 durante o HS1 e Holoceno médio, provocariam incisão fluvial e maior continuidade dos
423 habitats de substrato rochoso e corredeiras. Já fases climáticas mais secas, como durante
424 o último máximo glacial, favoreceriam acúmulo de sedimentos e fragmentação dos

425 setores de substrato rochoso e corredeiras e forçariam o isolamento de populações
426 dependentes destes habitats.

427 Este padrão de estruturação populacional na família Loricariidae já foi
428 evidenciado para espécies do gênero *Hypostomus*. Carvalho et al. [42] utilizando
429 sequências do marcador mitocondrial ATPase 6/8 descreveram os padrões
430 filogeográficos da espécie *Hypostomus ancistroides* na bacia do rio Paraná, onde
431 identificou 12 populações bem estruturadas com profundas diferenças genéticas, padrão
432 que segundo os autores pode estar relacionado às características das espécies e mudança
433 nas condições dos ambientes. Já Borba et al. [56] com intuito de testar se as populações
434 de *Hypostomus strigaticeps* de quatro sub bacias do rio Paraná encontravam-se
435 estruturadas ou compreendiam espécies crípticas realizaram análises filogeográficas e
436 filogenéticas utilizando também o marcador ATPase 6/8. Assim, estes autores
437 constataram a separação dessas populações em duas linhagens, no entanto,
438 representativas da mesma espécie.

439 Em relação aos marcadores nucleares, quase todas as análises de estrutura
440 populacional não corroboraram o cenário de subdivisão observado com o mtDNA. Isto,
441 não descarta a existência das cinco populações de *B. xantheilus* ao longo de sua área de
442 distribuição, pois regiões nucleares retratam eventos mais antigos quando comparados
443 com os marcadores mitocondriais. Desse modo, essas regiões nucleares podem não
444 retratar eventos recentes de separação de linhagens [57].

445 **História Demográfica**

446 As estatísticas D e F_s apresentaram valores negativos para praticamente todas as
447 amostras, rejeitando a hipótese de evolução neutra e que poderia indicar que a
448 população total poderia estar sob influência de processo de expansão recente, conforme
449 Fu [34].

450 Em adição as curvas do EBSP corroboram os resultados dos testes de
451 neutralidade, sugerindo que as populações A e C iniciaram uma expansão populacional
452 há cerca de 200 mil anos. Em contraste, as populações B e D permaneceram estáveis.

453 As mudanças climáticas ocorrentes no Pleistoceno estiveram fortemente
454 relacionadas a alterações no ciclo hidrológico dos rios. A precipitação amazônica recebe
455 grande influência do Sistema de Monção da América do Sul (SMAS) [58], cuja
456 intensidade seguiu ciclos de insolação, pontuados por eventos climáticos abruptos
457 durante o Quaternário tardio [39]. Variabilidade correspondente é observada para a
458 vazão dos rios amazônicos durante os últimos 250.000 anos [59]. O acoplamento entre
459 precipitação amazônica e mudanças climáticas globais permite deduzir mudança na
460 variabilidade do SMAS e conseqüente alteração da dinâmica hidrológica amazônica
461 após a transição climática do Pleistoceno médio, finalizada há 700.000 anos [60]. A
462 partir de 700.000 anos atrás, ocorreu importante aumento da amplitude e diminuição da
463 frequência dos ciclos climáticos, os quais passaram a ser dominados por ciclos de
464 100.000 anos (períodos glaciais e interglaciais) forçados por variações de insolação
465 governadas pela excentricidade da órbita da Terra. Esta mudança do sistema climático
466 terrestre proporcionaria fases secas e úmidas mais extremas de maior duração e com
467 capacidade de induzirem mudanças fisiográficas mais persistentes e de maior
468 abrangência geográfica.

469 A expansão populacional de *B. xanthellus* descrita para os últimos 200.000 anos
470 pode resultar da expansão de longo prazo dos ambientes de corredeiras devido ao
471 fortalecimento do SMAS. Contudo, períodos milenares mais secos, tal como durante o
472 último máximo glacial, provocariam fragmentação e redução de curta duração dos
473 habitats de corredeiras. Esta dinâmica hidrológica com ciclos de 100.000 anos
474 sobrepostos por variabilidade milenar poderia explicar a alta diversidade genética e

475 expansão populacional de *B. xantheilus*. Esta hipótese implica ocorrência deste padrão
476 filogeográfico para outras espécies da família Loricariidae, com mesma dinâmica
477 biológica e tempo de geração.

478 **Considerações finais**

479 Este trabalho é o primeiro esforço realizado para avaliar os padrões
480 filogeográficos da espécie *B. xantheilus*, usando marcadores mitocondriais e nucleares e
481 uma ampla amostragem abrangendo toda sua área de distribuição.

482 Para o marcador Cyt b, os resultados demonstraram que *B. xantheilus* apresenta
483 cinco haplogrupos bem definidos com altos valores de diversidade genética, que pode
484 estar relacionado a mudanças hidrológicas ocorridas na Amazônia durante o
485 Quaternário tardio. Este mesmo padrão não foi verificado para os marcadores nucleares,
486 certamente por tratar-se de eventos recentes de diversificação.

487 Também foi verificado por meio das inferências demográficas que algumas
488 dessas populações sofreram um evento de expansão populacional, que provavelmente
489 pode ser resultado do fortalecimento do Sistema de Monção da América do Sul (SMAS)
490 durante o Pleistoceno, período no qual a correnteza do rio Xingu era mais forte,
491 conectando regiões que hoje estão separadas por remansos intercalados.

492 Estratégias de conservação para a espécie devem levar em consideração esse
493 padrão filogeográfico, uma vez que impactos locais irreversíveis causados pela Usina
494 Hidrelétrica de Belo Monte podem causar perda de variabilidade genética ao impedir,
495 abruptamente, o fluxo gênico. Além disso, devem ser consideradas as atividades de
496 pesca ornamental com cautela e monitoramento, incentivando-se a captura moderada
497 em diversas regiões evitando, assim, a sobrepesca em apenas um local.

498

499 **Agradecimentos**

500 Os autores agradecem à equipe do Projeto de Monitoramento da Ictiofauna da
 501 UHE Belo Monte pela disponibilização do material para estudo; ao ICMbio, pelas
 502 coletas nas Reservas Extrativistas do Xingu e do Iriri, Parque Nacional da Serra do
 503 Pardo e Estação Ecológica da Terra do Meio. Agradecem também aos colegas dos
 504 Laboratórios de Ictiologia de Altamira (UFPA/Altamira), Genética Aplicada
 505 (UFPA/Bragança) e de Ictiologia e Biodiversidade Subterrânea da Amazônia
 506 (UFPA/Bragança). Também agradecem pelo financiamento a pesquisa ao projeto
 507 iXingu (NSF- DEB-1257813), projeto Universal CNPq (processo 486376/2013-3) e a
 508 FAPESPA/VALE S.A. pelo apoio financeiro para obtenção dos dados moleculares
 509 (ICAAF 043/2011) sob coordenação de J. M-C.

510 **Referências**

- 511 1. Armbruster JW. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured
 512 catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae.
 513 Zool J Linn Soc. 2004;141: 1–80. doi:10.1111/j.1096-3642.2004.00109.x
- 514 2. Reis RE, Pereira EHL, Armbruster JW. Delturinae, a new loricariid catfish
 515 subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and
 516 *Hemipsilichthys*. Zool J Linn Soc. 2006;147: 277–299.
- 517 3. Eschmeyer WN, Fong JD. Catalog of fishes. Species by
 518 Family/Subfamily. Updated internet version. Catalog databases of California
 519 Academy of Sciences. [Internet]. 2016 [cited 14 Dec 2016]. Available:
 520 [http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.as](http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp/)
 521 [p/](http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp/)
- 522 4. Camargo M, Ghilardi R. Entre a terra, as águas e os pescadores do médio rio
 523 Xingu: uma abordagem ecológica. Belém; 2009.
- 524 5. Reis RE, Kullander SO, Jr. CJF. Check List of the Freshwater Fishes of South
 525 and Central America. 2003.
- 526 6. Camargo M, Giarrizzo T, Isaac V. Review of the Geographic Distribution of Fish
 527 Fauna of the Xingu River Basin , Brazil. ECOTROPICA Soc Trop Ecol.
 528 2004;10: 123–147.
- 529 7. Py-Daniel LR, Zuanon J, de Oliveira RR. Two new ornamental loricariid
 530 catfishes of *Baryancistrus* from rio Xingu drainage (Siluriformes:
 531 Hypostominae). Neotrop Ichthyol. 2011;9: 241–252. doi:10.1590/S1679-
 532 62252011000200001

- 533 8. Medeiros LA, Ginani EG, Sousa LM, Py-Daniel LHR, Feldberg E. Cytogenetic
534 analysis of *Baryancistrus xanthellus* (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini), an
535 ornamental fish endemic to the Xingu River, Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2016;14.
536 doi:10.1590/1982-0224-20150108
- 537 9. Sampaio ZJA. História Natural da Ictiofauna de Corredeiras do rio Xingu, na
538 região de Altamira, Pará [Internet]. 1999. p. 199. Available:
539 <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000189142>
- 540 10. Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, et al.
541 Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between
542 Population Genetics and Systematics. *Annu Rev Ecol Syst.* 1987;18: 489–522.
543 doi:10.1146/annurev.es.18.110187.002421
- 544 11. Avise JC. Phylogeography: retrospect and prospect. *J Biogeogr.* 2009;36: 3–15.
545 doi:10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x
- 546 12. Allendorf FW, Hohenlohe P a, Luikart G. Genomics and the future of
547 conservation genetics. *Nat Rev Genet.* 2010;11: 697–709. doi:10.1038/nrg2844
- 548 13. Steiner CC, Putnam AS, Hoeck PEA, Ryder O. Conservation Genomics of
549 Threatened Animal Species. *Annu Rev Anim Biosci.* 2013;1: 261–281.
550 doi:10.1146/annurev-animal-031412-103636
- 551 14. Paithankar KR, Prasad KS. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and
552 ethanol. *Nucleic Acids Res.* 1991;19: 1346.
553 doi:<http://dx.doi.org/10.1093/nar/19.6.1346>
- 554 15. Sanger F, Nicklen S, Coulson a R. DNA sequencing with chain-terminating
555 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74: 5463–5468.
556 doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- 557 16. Sevilla RG, Diez A, Norén M, Mouchel O, Jérôme M, Verrez-Bagnis V, et al.
558 Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish
559 based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Mol Ecol*
560 *Notes.* 2007;7: 730–734. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01863.x
- 561 17. Pinho C, Rocha S, Carvalho BM, Lopes S, Mourão S, Vallinoto M, et al. New
562 primers for the amplification and sequencing of nuclear loci in a taxonomically
563 wide set of reptiles and amphibians. *Conserv Genet Resour.* 2010;2: 181–185.
564 doi:10.1007/s12686-009-9126-4
- 565 18. Blel H, Panfili J, Guinand B, Berrebi P, Said K, Durand JD. Selection footprint at
566 the first intron of the *Prl* gene in natural populations of the flathead mullet (*Mugil*
567 *cephalus*, L. 1758). *J Exp Mar Bio Ecol.* 2010;387: 60–67.
568 doi:10.1016/j.jembe.2010.02.018
- 569 19. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
570 program for Windows 95/98/NT [Internet]. *Nucleic Acids Symposium Series.*
571 1999. pp. 95–98. doi:citeulike-article-id:691774
- 572 20. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity
573 of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,
574 position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*
575 1994;22: 4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673

- 576 21. Stephens M, Donnelly P. Report A Comparison of Bayesian Methods for
577 Haplotype Reconstruction from Population Genotype Data. *Am J Hum Genet.*
578 2003;73: 1162–1169. doi:10.1086/379378
- 579 22. Librado P, Rozas J. DnaSP v5 : A software for comprehensive analysis of DNA
580 poly- morphism data. *Bioinformatics.* 2009;25: 1451–1452.
- 581 23. Flot JF. Seqphase: A web tool for interconverting phase input/output files and
582 fasta sequence alignments. *Mol Ecol Resour.* 2010;10: 162–166.
583 doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02732.x
- 584 24. Bruen TC. A Simple and Robust Statistical Test for Detecting the Presence of
585 Recombination. *Genetics.* 2005;172: 2665–2681.
586 doi:10.1534/genetics.105.048975
- 587 25. Huson DH. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol*
588 *Biol Evol.* 2005;23: 254–267. doi:10.1093/molbev/msj030
- 589 26. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to
590 perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol*
591 *Resour.* 2010;10: 564–567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- 592 27. Salzburger W, Ewing GB, Von Haeseler A. The performance of phylogenetic
593 algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Mol Ecol.*
594 2011;20: 1952–1963. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05066.x
- 595 28. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New
596 algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing
597 the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59: 307–321.
598 doi:10.1093/sysbio/syq010
- 599 29. Corander J, Marttinen P. Bayesian identification of admixture events using
600 multilocus molecular markers. *Mol Ecol.* 2006;15: 2833–2843.
601 doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02994.x
- 602 30. Corander J, Waldmann P, Sillanpää MJ. Bayesian analysis of genetic
603 differentiation between populations. *Genetics.* 2003;163: 367–374. doi:DOI
604 10.1093/bioinformatics/bth250
- 605 31. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred
606 from metric distances among DNA haplotypes: Application to human
607 mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 1992;131: 479–491.
608 doi:10.1007/s00424-009-0730-7
- 609 32. B. S. Weir and C. Clark Cockerham. Estimating F-Statistics for the Analysis of
610 Population Structure. *Evolution (N Y).* 1984;38: 1358–1370.
- 611 33. Parks DH, Mankowski T, Zangoeei S, Porter MS, Armanini DG, Baird DJ, et al.
612 GenGIS 2: Geospatial Analysis of Traditional and Genetic Biodiversity, with
613 New Gradient Algorithms and an Extensible Plugin Framework. Gilbert JA,
614 editor. *PLoS One.* 2013;8: e69885. doi:10.1371/journal.pone.0069885
- 615 34. Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth,
616 hitchhiking and background selection. *Genetics.* 1997;147: 915–925.
617 doi:genetics.org//147/2/915

- 618 35. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA
619 polymorphism. *Genetics*. 1989;123: 585–595. doi:PMC1203831
- 620 36. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. Bayesian coalescent
621 inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol*.
622 2005;22: 1185–1192. doi:10.1093/molbev/msi103
- 623 37. Zardoya R, Doadrio I. Molecular evidence on the evolutionary and
624 biogeographical patterns of European cyprinids. *J Mol Evol*. 1999;49: 227–237.
625 doi:10.1007/PL00006545
- 626 38. Tanabe AS. Kakusan: a computer program to automate the selection of a
627 nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on
628 multilocus data. *Mol Ecol Notes*. 2007;7: 962–964. doi:10.1111/j.1471-
629 8286.2007.01807.x
- 630 39. Cheng H, Sinha A, Cruz FW, Wang X, Edwards RL, D’Horta FM, et al. Climate
631 change patterns in Amazonia and biodiversity. *Nat Commun*. 2013;4: 1411.
632 doi:10.1038/ncomms2415
- 633 40. Avise JC. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge
634 M, editor. Harvard University Press; 2000.
- 635 41. Grant WS, Bowen BW. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary
636 Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons
637 for Conservation. *J Hered*. 1998;89: 415–426. doi:10.1093/jhered/89.5.415
- 638 42. Hollanda Carvalho P, Maia Queiroz Lima S, Henrique Zawadzki C, Oliveira C,
639 de Pinna M. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus*
640 *ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across
641 a Neotropical biogeographic region. *Mitochondrial DNA*. 2015;1736: 1–7.
642 doi:10.3109/19401736.2015.1079822
- 643 43. Kumari P, Pavan-Kumar A, Kumar G, Alam A, Parhi J, Gireesh-Babu P, et al.
644 Genetic diversity and demographic history of the giant river catfish *Sperata*
645 *seenghala* inferred from mitochondrial DNA markers. *Mitochondrial DNA Part*
646 *A*. 2016;0: 1–7. doi:10.1080/24701394.2016.1209195
- 647 44. Bignotto T, Prioli A, Prioli S, Maniglia T, Boni T, Lucio L, et al. Genetic
648 divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma*
649 *reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. *Brazilian J*
650 *Biol*. 2009;69: 681–689. doi:10.1590/S1519-69842009000300022
- 651 45. Vergara J, Azpelicueta MDLM, Garcia G. Phylogeography of the Neotropical
652 catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio de la Plata
653 basin, South America, and conservation remarks. *Neotrop Ichthyol*. 2008;6: 75–
654 85. doi:10.1590/S1679-62252008000100009
- 655 46. Silva WC da, Marceniuk AP, Sales JBL, Araripe J. Early Pleistocene lineages of
656 *Bagre bagre* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Ariidae), from the Atlantic coast of
657 South America, with insights into the demography and biogeography of the
658 species. *Neotrop Ichthyol*. 2016;14: e150184. doi:10.1590/1982-0224-20150184
- 659 47. Sawakuchi AO, Hartmann GA, Sawakuchi HO, Pupim FN, Bertassoli DJ, Parra
660 M, et al. The Volta Grande do Xingu: Reconstruction of past environments and

- 661 forecasting of future scenarios of a unique Amazonian fluvial landscape. *Sci*
662 *Drill.* 2015;20: 21–32. doi:10.5194/sd-20-21-2015
- 663 48. Sabaj Pérez M. Where the Xingu Bends and Will Soon Break. *Am Sci.* 2015;103:
664 395. doi:10.1511/2015.117.395
- 665 49. Reis RE. Conserving the freshwater fishes of South America. *Int Zoo Yearb.*
666 2013;47: 65–70. doi:10.1111/izy.12000
- 667 50. Lees AC, Peres CA, Fearnside PM, Schneider M, Zuanon JAS. Hydropower and
668 the future of Amazonian biodiversity. *Biodivers Conserv.* 2016;25: 451–466.
669 doi:10.1007/s10531-016-1072-3
- 670 51. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Livro Vermelho da
671 Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. v. 9. Instituto Chico Mendes de
672 Conservação da Biodiversidade; 2016.
- 673 52. Isaac V, Almeida, MC, Cruz, REA. and Nunes LG. Artisanal fisheries of the
674 Xingu River basin in Brazilian Amazon. *Brazilian J Biol.* 2015;75: 125–137.
675 doi:http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.00314BM
- 676 53. Camargo M, Junior HG, Sousa LM de, Py-Daniel LR. Loricariids of the Middle
677 Rio Xingu. 2°. Hannover: Panta Rhei; 2013.
- 678 54. Wang X, Edwards RL, Auler AS, Cheng H, Kong X, Wang Y, et al.
679 Hydroclimate changes across the Amazon lowlands over the past 45,000 years.
680 *Nature.* 2017;541: 204–207. doi:10.1038/nature20787
- 681 55. Zhang Y, Zhang X, Chiessi CM, Mulitza S, Zhang X, Lohmann G, et al.
682 Equatorial Pacific forcing of western Amazonian precipitation during Heinrich
683 Stadial 1. *Sci Rep.* 2016;6: 35866. doi:10.1038/srep35866
- 684 56. de Borba RS, Zawadzki CH, Oliveira C, Perdices A, Parise-Maltempo PP, Alves
685 AL. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae)
686 inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River
687 basin. *Neotrop Ichthyol.* 2013;11: 111–116.
- 688 57. Zink RM, Barrowclough GF. Mitochondrial DNA under siege in avian
689 phylogeography. *Mol Ecol.* 2008;17: 2107–2121. doi:10.1111/j.1365-
690 294X.2008.03737.x
- 691 58. Zhou J, Lau KM. Does a Monsoon Climate Exist over South America? *J Clim.*
692 1998;11: 1020–1040.
- 693 59. Govin A, Chiessi CM, Zabel M, Sawakuchi AO, Heslop D, Hörner T, et al.
694 Terrigenous input off northern South America driven by changes in Amazonian
695 climate and the North Brazil Current retroflexion during the last 250 ka. *Clim*
696 *Past.* 2014;10: 843–862. doi:10.5194/cp-10-843-2014
- 697 60. Clark PU, Archer D, Pollard D, Blum JD, Rial JA, Brovkin V, et al. The middle
698 Pleistocene transition: characteristics, mechanisms, and implications for long-
699 term changes in atmospheric pCO₂. *Quat Sci Rev.* 2006;25: 3150–3184.
700 doi:10.1016/j.quascirev.2006.07.008

CONCLUSÃO GERAL

No estudo não foi possível reconhecer *B. xanthellus* e *Baryancistrus* sp. “verde” como espécies distintas, além disso, *Baryancistrus* é representado por sete MOTUS, sendo cinco apenas dentro de *B. xanthellus* e as demais sendo *B. chrysolomus* e *Baryancistrus* aff. *niveatus*.

Esses resultados ressaltam a importância da taxonomia integrativa combinando informações baseadas em identificação morfológica com dados moleculares, utilizando marcadores de DNA espécie-específicos.

Em relação ao padrão filogeográfico de *B. xanthellus*, os resultados para o marcador mitocondrial Cyt b apresentam cinco haplogrupos com altos valores de diversidade, que pode estar relacionado a mudanças hidrológicas ocorridas na Amazônia durante o Quaternário tardio. Este mesmo padrão não foi verificado para os marcadores nucleares, certamente por que se tratam de eventos recentes de diversificação.

Também foi verificado por meio das inferências demográficas que algumas dessas populações sofreram um evento de expansão populacional, que provavelmente pode ser resultado do fortalecimento do Sistema de Monção da América do Sul (SMAS) durante o Pleistoceno.

Estratégias de conservação para espécie devem levar em consideração esse padrão filogeográfico, uma vez que impactos locais causados pela Usina Hidrelétrica de Belo Monte podem causar perda de variabilidade genética e impedir o fluxo gênico. Além disso, devem ser consideradas as atividades de pesca ornamental com cautela, incentivando-se a captura moderada em diversas regiões, evitando, assim, a sobrepesca em apenas um local.