

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAQUEL PATELLA DE AZAMBUJA

A EXTENSÃO DE SINAL DEMOGRÁFICO DE ESPÉCIES DE PEIXES NA  
REGIÃO LESTE DO PARANÁ

CURITIBA

2013

RAQUEL PATELLA DE AZAMBUJA

A EXTENSÃO DE SINAL DEMOGRÁFICO DE ESPÉCIES DE PEIXES NA  
REGIÃO LESTE DO PARANÁ

Monografia apresentada ao Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel com ênfase em Biodiversidade pelo curso de Ciências Biológicas.

Co-orientador: M. Sc. Marcel K. Tschá

Orientador: Prof. Walter A. Boeger PhD.

CURITIBA

2013

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente à minha mãe, Márcia Bacelo Patella. Mãe, muito obrigada por todo o amor, incentivo, confiança e companhia. Obrigada por acreditar em mim, investir em meus estudos e me ajudar diante às dificuldades. Eu não alcançaria a felicidade sem sua companhia, apoio e alegrias durante todos esses anos. Da mesma forma agradeço à minha irmã, Luciana Patella, que me acompanhou durante todos os anos da minha vida, principalmente nesta caminhada durante a graduação.

Tenho um agradecimento muito especial a fazer ao meu Orientador Walter A. Boeger que acreditou em mim em todos os momentos, com incentivo, conversas e aprendizado. Agradeço pelo apoio acadêmico e pessoal. À Regina Boeger, agradeço as conversas, o apoio e a atenção. Aos dois, gostaria de agradecer o amparo nos momentos difíceis e a presença nas minhas vitórias e conquistas.

Ao meu co-orientador, Marcel K. Tschá, por tantos anos de aprendizado, desde o início da graduação até o último instante. Entre projetos, protocolos, tomadas de decisões e amizade, muito contribuiu para minha formação pessoal e profissional.

Agradeço à equipe responsável pelos projetos realizados no Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE), os quais geraram dados indispensáveis para essa pesquisa.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná que compartilharam com os alunos seus conhecimentos e experiências.

Aos melhores amigos e aos companheiros de laboratório registro meus agradecimentos por todos os momentos maravilhosos e a especial presença de cada um em minha vida.

*A sua estrada é somente sua. Outros podem acompanhá-lo, mas ninguém pode andar por você.*

Rumi

## RESUMO

Flutuações do nível do mar decorrentes de eventos climáticos como ciclos glaciais podem influenciar a história demográfica, composição e distribuição da ictiofauna de pequenos rios costeiros. Estudos geomorfológicos indicam a ocorrência de sucessivas introgressões e regressões marinhas no litoral paranaense as quais ocasionaram ciclos de isolamento e reconexão de microbacias costeiras durante o início do Pleistoceno. Processos de eustasia, portanto, podem deixar assinaturas genéticas na história evolutiva das espécies. Dados paleoclimáticos analisados em conjunto com recursos genéticos representam ferramentas robustas capazes de elucidar os padrões e processos associados com a história demográfica de populações. Assim, esse estudo tem como objetivo avaliar a extensão geográfica de sinais demográficos aparentemente associados a processos de eustasia do litoral Paranaense. Para tal, sinais demográficos de cinco espécies de peixes distribuídas na Planície Litorânea, Primeiro e Segundo Planalto Paranaense foram reconstruídos utilizando DNAmT das seguintes espécies de peixes: *Astyanax altiparanae*, *Centropomus parallelus*, *Characidium lanei*, *Mimagoniates* aff. *microlepis* e *Rhamdia quelen*. Os resultados sugerem um grande evento ambiental responsável pelo aumento do tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) das espécies ao leste da Serra do Mar durante a penúltima glaciação. Populações amostradas dos planaltos não apresentam o mesmo padrão de variação do  $N_e$ . Assim, o resultado é consistente com uma influência única e microregional sobre os padrões demográficos nas bacias costeiras, provavelmente decorrentes de movimentos eustásicos. Os padrões demográficos distintos das espécies analisadas na região dos planaltos decorrem, provavelmente, de eventos distintos ou de influência diferenciadas sobre as espécies em decorrência de características biológicas inerentes de cada uma.

Palavras-Chave: História demográfica. Glaciação. Eustasia. DNAmT.

## ABSTRACT

Fluctuations of the sea-level deriving from climate events such as glacial cycles may influence demographic history, composition and distribution of fishes from small coastal rivers. Geomorphological studies indicated that successive marine introgressions and regressions have caused cycles of isolation and connection of populations in the microbasins in Parana coast during the Early Pleistocene. Eustasy processes, therefore, can leave genetic signatures in the evolutionary history of species. Paleoclimate data combined with genetic resources represent robust tools to elucidate the demographic history pattern of populations. Thus, this study aims to evaluate the geographic extent of demographic signals apparently associated with eustasy processes in the Parana coastal plain. Thus, demographic signals of five species of fish distributed in the Coastal Plain, and First and Second Paraná Plateau were reconstructed using mtDNA of the following fish species: *Astyanax altiparanae*, *Centropomus parallelus*, *Characidium lanei*, *Mimagoniates aff. microlepis* and *Rhamdia quelen*. The results suggest a major environmental event responsible for increasing the effective population size ( $N_e$ ) of species on the east side of Serra do Mar during the penultimate glaciation. Populations sampled from the highlands do not show the same pattern of  $N_e$  variation. This result is consistent with a single microregional influence on demographic patterns in the coastal basins, probably caused by eustatic movements. The distinct demographic patterns of the species analyzed in the highlands region derive, probably, of different events on the history of these species and are also a consequence of their inherent biological characteristics.

Keyword: Demographic history. Glaciation. Eustasy. mtDNA.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>08</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL .....	11
3.2	ESPÉCIES AMOSTRADAS .....	11
3.3	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E PROCEDIMENTO MOLECULAR .....	12
3.4	ANÁLISE DA HISTÓRIA DEMOGRÁFICA .....	15
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>24</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As formações geológicas da costa leste brasileira correspondente ao Período Quaternário (MARTIN *et al.*, 1993), foram fortemente influenciadas por flutuações do nível relativo do mar ao longo do litoral brasileiro. Esses processos eustáticos moldaram a formação das planícies costeiras (SUGUIO *et al.*, 1985; BIGARELLA 2001; SALLUN *et al.*, 2012). As alterações no nível do mar são capazes de afetar as dimensões e a estrutura do ambiente marinho, estuarino e de água doce de planícies, incluindo seus padrões de conectividade que podem resultar em subdivisões populacionais e contatos secundários (STURMBAUER, 1998; STURMBAUER *et al.*, 2001; EGGER *et al.*, 2007). Esses efeitos devem ser especialmente intensos em planícies costeiras localizadas entre o mar e os contrafortes da Serra do Mar. Ciclos glaciais durante o Pleistoceno promoveram eventos de conectividade e isolamento de habitats capazes de deixar assinaturas na história evolutiva de táxons da planície costeira devido à sua contribuição significativa na diversificação e geração da biodiversidade (NEVADO *et al.*, 2013) além de alterações no tamanho populacional.

As variações do nível do mar na costa sul-americana estão muitas vezes relacionadas a variações no volume de água oceânica de acordo com a temperatura global e volume dos oceanos referentes aos movimentos de placas tectônicas, mas estão principalmente relacionadas ao derretimento de calotas polares. Há 123 mil anos, aproximadamente, o nível do mar encontrava-se até 10 m acima do nível atual e 5,3 m há 5.100 anos (MARTIN *et al.*, 1996; MARTIN, 2003). Esses máximos foram separados por um evento de regressão ocorrido há 18 mil anos, durante o qual o oceano teria atingido cerca de 130 m abaixo do nível do mar atual no litoral sudeste brasileiro (KOWSMANN; COSTA, 1974). Segundo Angulo e Suguio (1995), há cerca de 3.500 anos o estado do Paraná apresentava um nível do mar de aproximadamente 3 m acima do valor atual. Esta máxima ocorrida no Holoceno seria o suficiente para inundar a grande planície costeira do estado (ANGULO; SUGUIO, 1995).



A geomorfologia da microbacia do Rio Nhundiaquara e da Baía de Paranaguá no litoral paranaense sugere que no início do Pleistoceno tenha ocorrido isolamento geográfico nas populações de sub-bacias do litoral no período de soerguimento da massa continental (BIGARELLA, 2001; MAACK, 2001). Reconstituições da história demográfica realizadas para espécies aquáticas continentais da planície costeira paranaense recuperaram um sinal de gargalo populacional semelhante em intensidade e data na análise em táxons filogeneticamente distantes, tais como parasitos e seus hospedeiros (vide BUENO-SILVA, 2011; FERREIRA, 2012). Por exemplo, eventos de gargalo e subsequente expansão demográfica em populações de *Scleromystax* sp. foram apontados por Bueno-Silva (2011). As evidências sugerem que o gargalo coincide com a elevação dos níveis do mar e consequente redução da extensão dos habitats de água doce representados pelas bacias hidrográficas da planície costeira (BUENO-SILVA, 2011; FERREIRA, 2012).

Esses resultados sugerem uma relação íntima entre as flutuações demográficas da fauna do leste paranaense e eventos ambientais extensos, e.g flutuações do nível do mar, e suas consequências. Porém, até o presente, poucos testes foram realizados a fim de avaliar a extensão desse evento hipotético de gargalo genético seguido por uma expansão populacional.

Eventos ambientais de grande amplitude e seus efeitos em populações e comunidades podem ser avaliados e melhor compreendidos com o auxílio da ecologia molecular. A análise integrada de eventos paleoclimáticos e geomorfológicos juntamente a evidências genéticas permitem avaliar e testar hipóteses sobre processos que induziram a diversificação de populações e clados locais. Portanto, o presente trabalho testa se o padrão demográfico de gargalo genético com subsequente expansão demográfica observado em táxons da planície costeira paranaense reflete um evento localizado, portanto compatível com a hipótese da influência de oscilações do nível do mar, ou regional de origem distinta, que teria, portanto afetado também espécies dos planaltos de altitude.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os padrões de sinal demográfico das populações de cinco espécies a partir das suas distribuições espaciais entre Planície Litorânea e Planaltos de Altitude do estado do Paraná, Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Apontar a existência de um evento climático/ambiental correlacionado aos sinais demográficos de cinco espécies de peixes;
- Sugerir a extensão geográfica do evento hipotético associado ao perfil demográfico encontrado;
- Direcionar estudos subsequentes com o intuito de estabelecer a origem e natureza desse evento (ou conjunto de eventos).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Para testar a extensão do evento causador do padrão demográfico populacional observado em espécies dos ambientes continentais aquáticos da planície costeira paranaense, foram amostradas espécies de diferentes regiões da seguinte maneira: 1. Espécies de água doce ou marinha dependente de água doce da Planície Litorânea; 2. Espécies de ambientes aquáticos continentais do Primeiro e Segundo Planalto Paranaense. Assim, se o sinal de expansão estiver realmente relacionado a processos históricos limitados a regiões costeiras (e.g. variação do nível do mar) as espécies amostradas desse local devem apresentar o mesmo sinal de expansão genética na reconstrução de sua história demográfica. Nesse caso, os sinais de expansão em espécies do Primeiro e Segundo Planalto devem estar ausentes ou, se ocorrer, devem discordar em datação de amplitude daquele ocorrido para espécies da Planície Litorânea. Se todas as espécies avaliadas apresentarem sinais de expansão demográfica compatíveis, o evento deve ser considerado de maior extensão (e.g. alteração climática) e sua influência não terá sido microregional (i.e. apenas no ambiente costeiro).

#### 3.2 ESPÉCIES AMOSTRADAS

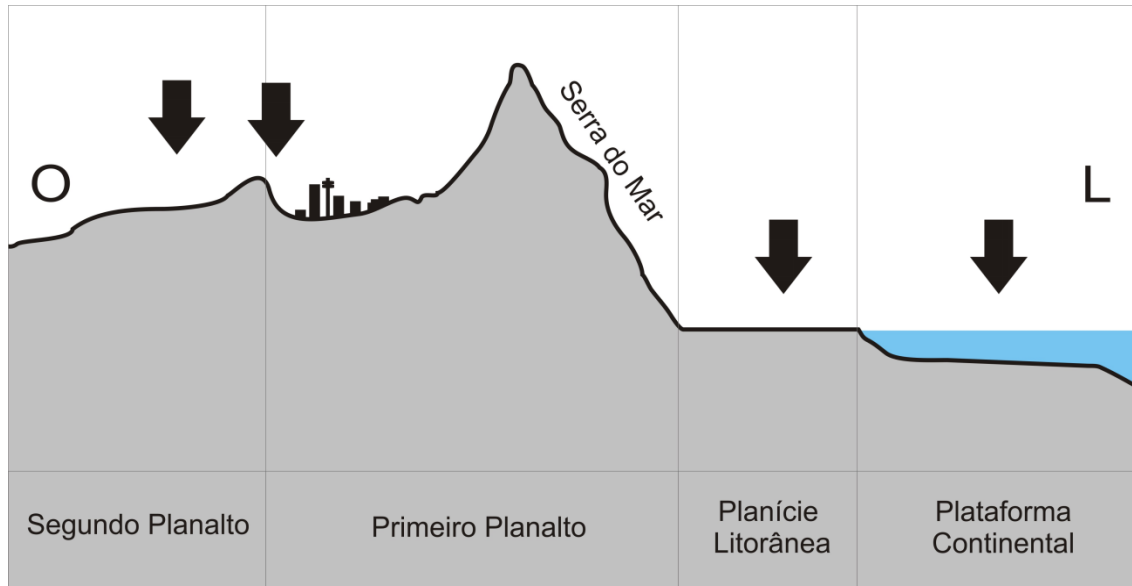
Populações de cinco espécies distintas de peixes foram escolhidas a fim de estudar o sinal demográfico de cada população em diferentes regiões do estado do Paraná. Sequências de DNA das espécies *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000), *Characidium lanei* (Travassos, 1967), *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), *Mimagoniates aff. microlepis* (Steindachner, 1876) e *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) foram compiladas para o presente estudo. A seleção das cinco espécies teve como base a disponibilidade de dados genéticos para análise e distribuição regional das populações.

*Centropomus parallelus* (Perciformes), conhecido popularmente como robalo-peva, ocorre nas águas salgadas e salobras da costa leste brasileira, desde o sul do Estado de Santa Catarina até o Maranhão. *Mimagoniates microlepis* (Characidae), a piaba azul, ocorre desde a região norte do estado do Espírito Santo até a região nordeste do Rio Grande do Sul (WEITZMAN *et al.*, 1988). No estado do Paraná, pode ser encontrada ao longo da Planície Costeira e riachos do Rio Iguaçu. Comumente chamada de jundiá, *R. quelen* (Heptapteridae, Siluriformes) distribuiu-se em regiões neotropicais, desde o sudeste ao norte do México e norte e centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). Essa espécie de bagre vive em lagos e poços fundos de rios de águas calmas junto às margens e vegetação (GUEDES, 1980). *Characidium lanei* (Crenuchidae, Characiformes), conhecida popularmente como “mocinha”, apresenta distribuição neotropical sendo encontrada em bacias costeiras da região Sul e Sudoeste do Brasil. O lambari-do-rabo-amerano, *A. altiparanae* (Tetragonopterinae), é a espécie mais amplamente distribuída dentre os Characiformes, sendo encontrada nas bacias do Rio Iguaçu e Paraná (CASATTI *et al.*, 2001).

### 3.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E PROCEDIMENTO MOLECULAR

Indivíduos das cinco espécies indicadas acima foram coletados no litoral do Paraná e no Primeiro e Segundo Planalto Paranaense (Fig. 1). *Mimagoniates* aff. *microlepis* foram obtidos do Primeiro Planalto no município de Balsa Nova-PR em afluente do Rio Iguaçu. *Astyanax altiparanae* e *R. quelen* foram coletados no Segundo Planalto no município da Lapa-PR, também na bacia hidrográfica do Rio Iguaçu. *Characidium lanei* e outro grupo de indivíduos de *M. aff. microlepis* foram capturados no Rio Marumbi na Planície Litorânea, município de Morretes-PR. Espécimes de *Ce. parallelus* foram coletados nas bacias de Paranaguá-PR e Guaratuba-PR, representando a única espécie marinha, porém de hábitos reprodutivos estuarinos e dependente de água doce. Número de animais amostrados e georreferenciamento dos pontos amostrais são apresentados na Tabela 1.

Parte do tecido dos espécimes foi retirada no momento da coleta e conservada em solução tampão EDTA-DMSO (SEUTIN *et al.*, 1991).



**Figura 1** – Perfil geomorfológico de parte do estado do Paraná com destaque das setas escuras para as regiões de coleta do material biológico nos planaltos de altitude e no litoral paranaense.

Os fragmentos do DNAm<sub>t</sub> selecionados para as análises foram: Citocromo-b (Cyt-b) para as cinco espécies, Citocromo Oxidase subunidade I (COI), exclusivamente para *R. quelen*, e a região controladora do DNAm<sub>t</sub> (D-loop), exclusivamente para *A. altiparanae*. As coordenadas geográficas e o número amostral de cada espécie utilizado para cada fragmento de DNA são detalhados na Tabela 1. As sequências de DNA utilizadas nesse estudo, com exceção de *M. aff. microlepis* e *R. quelen*, são as mesmas utilizadas nos trabalhos de Prodocimo *et al.* (2008), Pie *et al.* (2009), Ferreira (2012).

**Tabela 1** – Detalhamento do local de coleta, espécie e número amostral referente aos respectivos fragmentos do DNAm.

Região	Coordenadas Geográfica	Espécies	Nº / gene		
			Cyt-b	D-loop	COI
Primeiro Planalto	25° 33' 55" S 49° 42' 44" O	<i>Mimagoniates aff. microlepis</i>	17	.	.
Segundo Planalto	25° 47' 40" S 50° 11' 54" O	<i>Astyanax altiparanae</i>	9	20	.
		<i>Rhamdia quelen</i>	41	.	41
Planície Litorânea	25° 30' 54" S 48° 52' 03" O	<i>Mimagoniates aff. microlepis</i>	48	.	.
		<i>Characidium lanei</i>	19	.	.
Plataforma Continental	25° 41' S 48° 38' O	<i>Centropomus parallelus</i>	89	.	.

As amostras foram conservadas em ambiente refrigerado até o momento da extração do DNA através do kit EZ-DNA (Biosystems®) adotando protocolo do fabricante. O material genético extraído foi utilizado para a amplificação do fragmento de DNAm de interesse com protocolo otimizado para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As PCRs foram realizadas com um volume total de 25 µl contendo uma mistura de: 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 mM de dNTPs; tampão (buffer) 1x; 0,5 U da enzima *Taq polymerase*; 2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 2). O material genético foi amplificado a uma temperatura de denaturação inicial de 94 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos de denaturação a 94 °C por 45 s, anelamento variando entre 51 e 60 °C (de acordo com o fragmento pretendido) por 45 s, extensão a 72 °C durante 1 min e ao fim do último ciclo uma extensão final a 72 °C por 5 min.

**Tabela 2** – Especificações dos iniciadores moleculares utilizados para a amplificação de cada fragmento de DNA.

Gene	Nome do Iniciador	Sequência	Referência
Cyt-b	GLUDG.L	5' TGACCTRAACCAYCGTTG 3'	PALUMBI, 1996
	H16460	5' CGAYCTTCGGATTACAAGACCG 3'	PERDICES & DOADRIO, 2001
D-loop	H16498	5' CACCTGAAGTAGGAACCAGATG 3'	MEYER <i>et al.</i> , 1990
	L15774M	5' ACATGAATTGGAGGTATACCAGT 3'	PRIOLI <i>et al.</i> , 2002
COI	HCO	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	FOLMER <i>et al.</i> , 1994
	LCO	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'	FOLMER <i>et al.</i> , 1994

O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado em Brometo de Etídio para posterior visualização em luz UV. As amostras comprovadamente amplificadas foram purificadas com a utilização do kit MinElute<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>) ou Microcon<sup>®</sup> Unidades de Filtro de Centrífuga (Millipore<sup>®</sup>) ou protocolo para uso de PEG (PEG 8.000 20% NaCl 2,5M). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados em um sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems<sup>®</sup>) utilizando protocolo indicado para o equipamento. As sequências foram editadas manualmente no programa BioEdit v.7.0.9 (HALL, 1999) e alinhadas no programa MUSCLE 3.7 (EDGAR, 2004).

### 3.4 ANÁLISE DA HISTÓRIA DEMOGRÁFICA

A escolha do modelo de substituição para o alinhamento das sequências de DNAm de cada espécie foi realizada através do programa jModelTest v.1.1 (POSADA *et al.*, 2008) por selecionar estatisticamente o melhor ajuste de modelos de substituição de nucleotídeos. Os modelos com o menor valor de evolução molecular foram escolhidos seguindo os critérios de informação de Akaike corrigido (AICc) para os fragmentos Cyt-b, D-loop e COI foram usados na análise de reconstrução da história demográfica das populações (Tabela 3). Essa reconstrução foi inferida por análise de coalescência *Bayesian Skyline Plot* através dos programas BEAST v.1.7.5. (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007) e Tracer v.1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND,

2007). Os parâmetros da análise Bayesiana foram estimados com dados não particionados, quatro corridas independentes com 50 milhões de gerações, amostragem a cada 1.000 árvores, *burn-in* de 1.000 árvores e frequência de bases estimada. A taxa de mutação utilizada para Cyt-b foi de 0,0076 mutações/sítio/milhões de anos (ZARDOYA; DOADRIO, 1999); para D-loop de 0,0167 mutações/sítio/milhões de anos (SIVASUNDAR et al., 2001) e para COI de 0,0045 mutações/sítio/milhões de anos (WEEB et al., 2004) (Tabela 3). Os valores para taxa de mutação utilizados na análise não conferem especificidade em nível taxonômico de espécie, porém, são os dados disponíveis na literatura com valores para grupos filogeneticamente mais próximos das espécies alvo.

**Tabela 3** – Modelos de substituição de nucleotídeos e taxa de mutação utilizada para cada espécie alvo.

Espécies	Modelo (AICc)			Taxa de Evolução (%)		
	Cyt-b	D-loop	COI	Cyt-b	D-loop	COI
<i>Centropomus parallelus</i>	TN	.	.	0,0076	.	.
<i>Characidium lanei</i>	HKY	.	.	0,0076	.	.
<i>Mimagoniates aff. microlepis*</i>	TrN+G	.	.	0,0076	.	.
<i>Mimagoniates aff. microlepis**</i>	TrN	.	.	0,0076	.	.
<i>Rhamdia quelen</i>	TN+I+G	.	TN+I	0,0076	.	0,0045
<i>Astyanax altiparanae</i>	TN	TN	.	0,0076	0,0167	.

\* *M. aff. microlepis* referente a Planície Litorânea Paranaense.

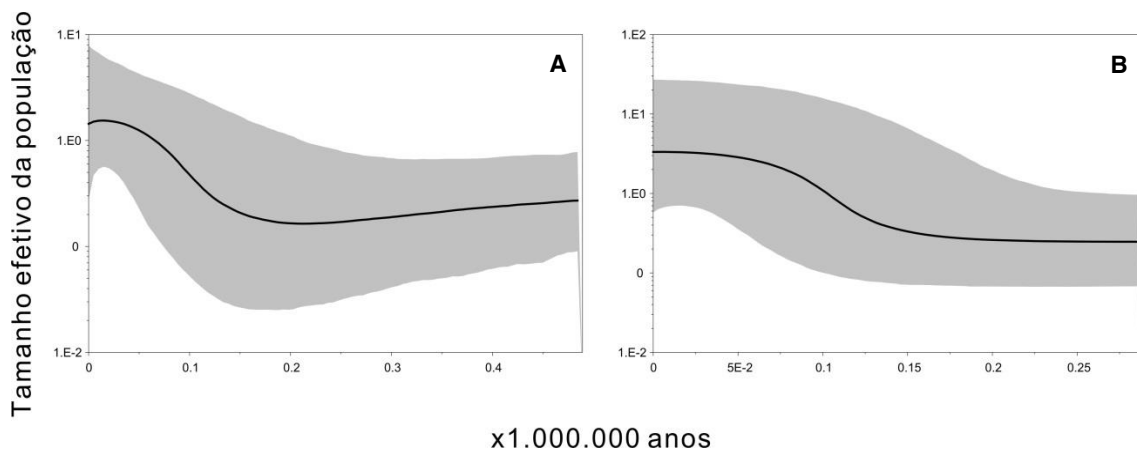
\*\* *M. aff. microlepis* referente ao Primeiro Planalto Paranaense.



## 4 RESULTADOS

A reconstrução demográfica foi obtida com o método de *skyline plot*, o qual é fundamentalmente baseado na teoria coalescente. Coalescência quantifica a relação entre a genealogia inferida a partir de sequências e a história demográfica da população. Foram utilizados alinhamentos de 872 pares de bases (pb) de Cyt-b e 481 pb de D-loop para *A. altiparanae*, 962 pb de Cyt-b para *Ch. lanei*, 577 pb de Cyt-b para *Ce. parallelus*, 914 pb de Cyt-b para *M. aff. microlepis* e 838 pb de Cyt-b e 572 pb de COI para *R. quelen*. Os resultados das análises da história demográfica mostram a relação entre o tamanho efetivo das populações ( $N_e$ ) (eixo y) ao longo do tempo (eixo x) (Fig. 2-4). O segmento de linha na cor preta indica o valor médio da população e o intervalo de confiança está representado pelo espaço em cinza.

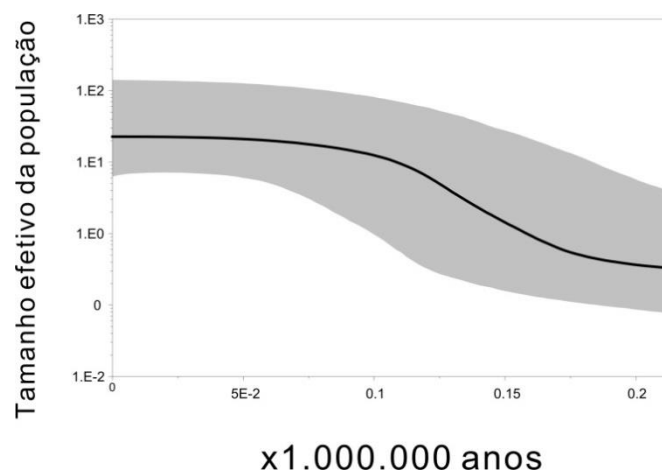
Ambas espécies de Characiformes da Planície Litorânea apresentaram sinal semelhante do histórico demográfico a partir de dados do DNAmT do gene Cyt-b (Fig. 2A e 2B).



**Figura 2** – *Skyline plots* das espécies da Planície Litorânea Paranaense a partir do fragmento de DNAmT Citocromo-b. A) *Mimagoniates aff. microlepis*; B) *Characidium lanei*.

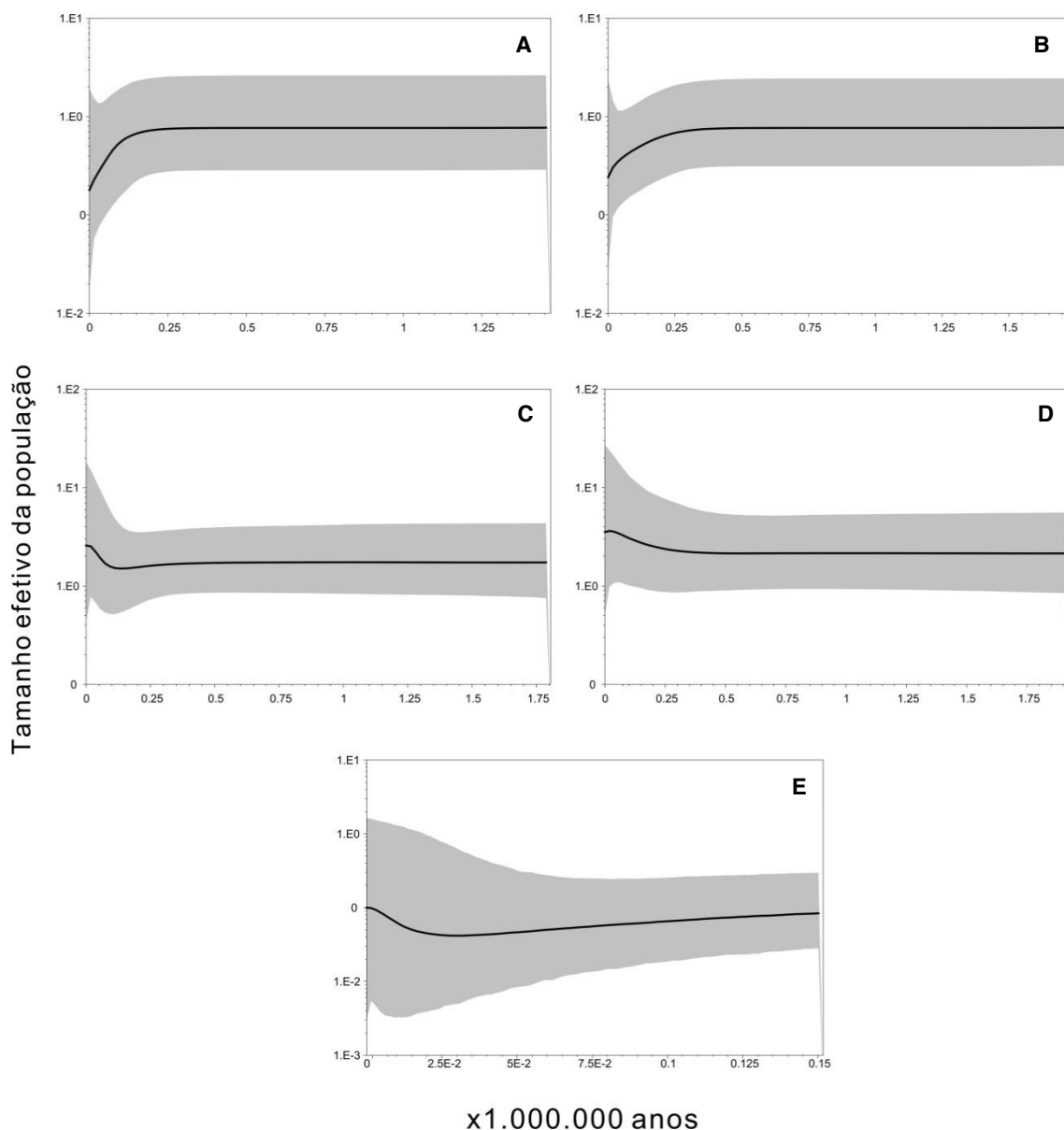
Para *M. aff. microlepis* (Fig. 2A) foi possível reconstruir quase 500 mil anos de história demográfica. Nessa reconstrução observa-se um leve declínio do  $N_e$  até 170 mil anos atrás, com um crescimento elevado subsequente do  $N_e$  até 25 mil anos atrás. A curva do  $N_e$  de *M. aff. microlepis* volta a representar um leve declínio até os dias atuais. O mesmo padrão é observado para *Ch. lanei*, com reconstrução de mais de 250 mil anos onde se observa um crescimento acentuado do  $N_e$  a partir de 150 mil até 50 mil anos atrás.

Uma história demográfica muito semelhante é observada para *Ce. parallelus*, Perciformes de vida marinha. Através da avaliação também do gene Cyt-b foi reconstruído seu histórico demográfico em pouco mais de 200 mil anos atrás. Essa reconstrução também indica um aumento do  $N_e$  próximo a 190 mil até 100 mil anos atrás (Fig. 3). Essa datação é um pouco anterior à apresentada para os peixes de água doce da Planície Litorânea.



**Figura 3** – Skyline plot a partir do fragmento de DNAm Citocromo-b para *Centropomus parallelus*.

Diferente dos resultados obtidos para as populações de peixes do litoral paranaense, as populações estudadas de espécies dos planaltos do Estado do Paraná apresentaram perfis distintos de história demográfica (Fig. 4).



**Figura 4** – Skyline plots das espécies do Primeiro e Segundo Planalto Paranaense: A e B) *Astyanax altiparanae*; B e C) *Rhamdia quelen*; E) *Mimagoniates* aff. *microlepis*. Em: A, C e E análises de Citocromo-b, em B da Região controladora do DNAmT e em D Citocromo subunidade I.

A história evolutiva da população de *A. altiparanae*, inferida pelo valor de  $N_e$ , apresentou uma redução acentuada a partir de 250 mil anos atrás (Fig. 4A e 4B). Embora tenha sido possível reconstruir o histórico demográfico da população em mais de 1 milhão de anos não se observa, em qualquer momento, um incremento do  $N_e$ , como ocorreu nas populações da Planície Litorânea. O resultado se repete para Cyt-b e D-loop. Por outro lado, a

população de *R. quelen* apresentou baixo aumento do  $Ne$  para os genes Cyt-b e COI a partir de 250 mil anos atrás, também em *skyline plots* que reconstruíram mais de 1,5 milhões de anos (Fig. 4C e 4D). No entanto, se analisada na mesma escala temporal dos *skyline plots* das populações litorâneas, não se observa incremento do  $Ne$  compatível com aqueles observados nas espécies da planície costeira. As histórias demográficas de populações de *M. aff. microlepis* do Primeiro Planalto e da Planície Litorânea foram reconstruídas pelo mesmo gene, Cyt-b, mas as curvas resultantes apresentaram padrões significativamente diferentes. As populações do Primeiro Planalto apresentaram uma redução gradativa a partir 150 mil anos atrás com um pequeno incremento a partir dos 20 mil anos atrás (Fig. 4E).

## 5 DISCUSSÃO

A ictiofauna dos Planaltos de Altitude e da Planície Litorânea Paranaense apresentaram diferentes perfis de histórias demográficas. Em geral, os perfis foram semelhantes entre si para as espécies coletadas na Planície Costeira e para a única espécie marinha amostrada, além de bastante variável para as populações amostradas nas regiões de Planalto. Na Planície Costeira, as mudanças temporais nas populações de *Ch. lanei*, *Ce. parallelus* e *M. aff. microlepis* demonstram influência de processos em nível microregional. Os *skyline plots* resultantes para essas três espécies de peixes apresentam um padrão de expansão do *Ne* semelhante. *Mimagoniates aff. microlepis* e *Ch. lanei* exibem uma curva acentuada de expansão de *Ne* há aproximados 120 mil anos. Curiosamente, essa datação corresponde ao momento em que o mar atingiu seu mais alto nível chegando a aproximadamente 10 m de altitude no decurso máximo de degelo interglacial (MARTIN *et al.* 1996; MARTIN, 2003). A expansão do *Ne* de *Ce. parallelus* iniciou anteriormente às outras duas espécies.

Esse resultado sugere que as três espécies de peixes costeiros ou marinhos sofreram influência de mudanças microrregionais ocorridas na Planície Costeira. Flutuações do nível do mar durante o Pleistoceno Médio e Pleistoceno Superior representam possíveis eventos associados ao padrão demográfico observado. A expansão observada representa as respostas dessas espécies decorrente da influência dessas flutuações e das variações da extensão e fragmentação das microbacias do litoral paranaense e aumento da amplitude na Planície Costeira.

A eustasia é correlacionada principalmente ao degelo e formação das calotas polares no decorrer dos eventos glaciais. Durante o Quaternário, pelo menos três processos de reconexões e isolamentos de rios e bacias estiveram envolvidos com movimentos de introgressões e regressões marinhas (SUGUIO *et al.*, 1985; MARTIN *et al.*, 1996). Diante de todos os resultados obtidos e informações paleoclimáticas (ANGULO; SUGUIO, 1995; BIGARELLA, 2001; MAACK, 2001; MARTIN *et al.*, 1993; MARTIN, 2003; SALLUN *et al.*, 2012; SUGUIO *et al.*, 1985) é possível sugerir que a flutuação no nível do mar

durante a penúltima glaciação tenha alcançado níveis de intensidade suficientes para direcionar a história evolutiva das populações da Planície Litorânea e Costeira.

Se de fato, variações do nível do mar influenciaram a história do tamanho efetivo das populações de peixes no litoral paranaense, é possível que variações cíclicas do nível do mar tenham influenciado processos sequenciais de isolamento e reconexão de bacias hidrográficas costeiras, promovendo a diversificação intra e inter-específica. A importância da variação do nível do mar como potencial gerador de diversidade em peixes de água doce já foi reconhecida (e.g. APRIL *et al.* 2012; NEVADO *et al.* 2013).

Nos planaltos a oeste da Serra do Mar, populações de *A. altiparanae*, *R. quelen* e *M. aff. microlepis* apresentam histórias demográficas singulares e discrepantes àquelas da costa. Os resultados não convergem para um padrão único, ou seja, cada população possui uma história independente não suportando a hipótese de influência de um evento comum relacionado para ambas espécies nessa região ou mesmo com as populações ao leste já mencionadas.

Com base nos resultados deste trabalho é possível sugerir que alterações no  $N_e$ , das espécies em questão, de peixes dos corpos hídricos de terras altas do estado paranaense não estariam relacionadas com os eventos que geraram o padrão microrregional de expansão demográfica observada nas espécies litorâneas supracitadas. Diferente do evidenciado por Bueno-Silva (2011) este estudo não obteve um padrão de gargalo genético com subsequente expansão demográfica para nenhuma das cinco espécies estudadas. O fato pode ser explicado pelas características biológicas inerentes da espécie analisada pelo autor.

Porém, ao observar as mudanças na linha do  $N_e$  em conjunto com as datações dos resultados de *skyline plots* não é possível descartar hipóteses de que outros eventos climáticos/ambientais estejam correlacionados às diferentes e incongruentes histórias demográficas dos peixes nos planaltos de altitude.

A falta de valores específicos para taxa de mutação das espécies alvo na literatura foi contornada pela utilização de taxas disponíveis para outros grupos de peixes. As diferenças encontradas nas datações para fragmentos de DNAmT pertencentes a diferentes genes indicam uma sutil discrepância diante

à estimativa temporal, como pôde ser observado em *A. altiparanae*. No entanto, os diferentes genes apresentados neste estudo, tanto para *A. altiparanae* quanto para *R. quelen*, alcançaram um sinal demográfico comum.

## 6 CONCLUSÃO

Os impactos aos quais o cenário pretérito possivelmente esteve exposto poderiam ser inúmeros. Sendo assim, torna-se viável a ideia de que as cinco espécies sofreram consequências geradas pela sequência de alterações climáticas ao longo do tempo, porém de modo e intensidade diferentes. As mudanças na ictiofauna regional podem estar intimamente relacionadas à diversidade das populações, efeitos de gargalo genético e consequentemente aumento ou perda de alelos (NEVADO *et al.*, 2013). Especialmente as populações analisadas ao leste da Serra do Mar apresentaram um padrão de explosão de tamanho efetivo populacional em um momento semelhante da história glacial o que indica a ação de um evento de grande intensidade. Este parece corresponder à eustasia do período quando o mar sofria um aumento em seu nível (MARTIN *et al.* 1996; MARTIN, 2003). Os resultados auxiliam a entender como espécies marinhas, como o robalo, são envolvidas pelo evento tanto quanto as espécies de água doce. A visível diferença entre *skyline plots* dos planaltos e da planície litorânea aponta a influência das introgressões e regressões de forma intensa na região costeira.

O estabelecimento de taxas de mutação específicas em nível taxonômico mais próximo às espécies alvo certamente fornecerá maior suporte às análises realizadas. Juntamente com a obtenção de novos dados, pesquisas adicionais poderão ser realizadas a partir deste modelo a fim de compreender a história evolutiva da fauna e flora em toda margem leste continental sul-americana avaliando os diferentes aspectos envolvidos, como por exemplo, tamanho da plataforma continental, tamanho de área inundada durante os milhares de anos de introgressão marinha e diferentes alturas que o mar alcançou ao longo da costa.



## REFERÊNCIAS

APRIL, J.; HANNER, R.H.; DION-CÔTÉ, A.M.; BERNATCHEZ, L. **Glacial cycles as an allopatric speciation pump in North Eastern American freshwater fishes.** *Molecular Ecology*, 22(2):409–422. 2012.

ANGULO R. J.; SUGUIO K. **Re-evaluation of the maxima of the Holocene sea-level curve for the State of Paraná, Brazil.** *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 112: 385-393. 1995.

BIGARELLA, J.J. **Contribuição ao estudo da planície litorânea do estado do Paraná.** *Braz. Arch.Biol. Technol., Jubilee*, volume (1946-2001), 65-110. 2001.

BUENO-SILVA, M. **Cofilogeografia: estruturação geográfica, demografia histórica e associação entre espécies de *Gyrodactylus* (Monogenoidea: Gyrodactylidae) e hospedeiros *Scleromystax* (Siluriformes: Callichthyidae).** Tese (Doutorado em Zoologia) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.

CASATTI, L.; LANGEANI, F.; CASTRO, R.M.C. **Peixes de riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do alto rio Paraná, SP.** *Biota Neotropica*, v. 1, n. 1, p. 1-15. 2001.

DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A. **BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.** *BMC Evol.Biol.* 7, 214. 2007.

EDGAR, R.C. **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797. 2004.

EGGER, B.; KOBLMÜLLER, S.; STURMBAUER, C.; SEFC, K.M. **Nuclear and mitochondrial data reveal different evolutionary processes in the Lake Tanganyika cichlid genus *Tropheus*.** *BMC Evolutionary Biology*, 7, 137. 2007.

FERREIRA, R.C.S. **Transmissão por larvas em parasitos Monogenoidea favorece a especialização por linhagens de hospedeiros? O contexto do compartilhamento de um Dactylogyridae (Monogenoidea, Platyhelminthes) em duas espécies sintópicas de *Characidium* (Characiformes).** Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e

Patologia) – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.** *Molecular Marine Biology & Biotechnology*, 3, 294–299. 1994.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae).** Santa Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. 1980.

HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Oxford University Press. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98. 1999.

KOWSMANN, R.O.; COSTA, M.P.A. **Paleolinhas de Costa na Plataforma Continental das regiões Sul e Norte Brasileiras.** *Revista Brasileira de Geociências*, 4 (4): 215-222. 1974.

MAACK, R. **Breves Notícias Sobre a Geologia dos Estados do Paraná e Santa Catarina.** *Braz. Arch. Biol. Technol. Jubilee*, volume (1946-2001), 169-288. 2001.

MARTIN, L.; SUGUIO, K.; FLEXOR, J.M. **As flutuações de nível do mar durante o Quaternário Superior e a evolução geológica de “deltas” brasileiros.** *Boletim IG-USP, Publicação Especial nº15*, 186p. 1993.

MARTIN, L.; SUGUIO, K.; FLEXOR, J.M.; DOMINGUEZ, J.M.L.; BITTENCOURT, A.C.S.P. **Quaternary Sea-level history and variation in Dynamics along the central Brazilian coast: consequences on coastal plain construction.** *Anais Academia Brasileira de Ciências*, 68: 303-354. 1996.

MARTIN, L. **Holocene sea-level history along eastern-southeastern Brazil.** *Anuário do Instituto de Geociências*, 26: 13-24. 2003.

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

NEVADO, B.; MAUTNER, S.; STURBAUER, C.; VERHEYENS, E. **Water-level fluctuations and metapopulation dynamics as drivers of genetic diversity in populations of three Tanganyikan cichlid fish species.** *Molecular Ecology*, 22, 3933–3948. 2013.

PALUMBI, S. R. **Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction.** In *Molecular Systematics* (ed. D. M. Hillis, C. Moritz B. K. Mable), pp. 205-247. Massachusetts: Sinauer Associates. 1996.

PERDICES, A.; DOADRIO, I. **The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19, 468–478. 2001.

PIE, M.R.; BAGGIO, R.A.; BOEGER, W.A.; PATELLA, L.; OSTRENSKY, A.; VITULE, J.R.S.; ABILHOA, V. **Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguaçú River.** *Journal of Fish Biology*, 75, 2357–2362. 2009.

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO JÚNIOR, H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. **Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers.** *Genetics and Molecular Biology* 25, 421–430. 2002.

PRODOCIMO, V.; TSCHÁ, M.K.; PIE, M.R.; OLIVEIRA-NETO, J.F.; OSTRENSKY, A.; BOEGER, W.A. **Lack of genetic differentiation in the fat snook *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) along the Brazilian coast.** *Journal of Fish Biology*, 73, 2075–2082. 2008.

POSADA, D. **jModelTest: phylogenetic model averaging.** *Molecular biology and evolution*, v. 25, n. 7, p. 1253-1256. 2008.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. **Tracer version 1.5 available from <http://beast.bio.ed.ac.uk>.** 2007.

SALLUN, A.E.M.; SALLUN, W.F.; SUGUIO, K.; BABINSKI, M.; GIOIA, S.M.C.L.; HARLOW, B.A.; DULEBA, W.; OLIVEIRA, P.E.; GARCIA, M.J.; WEBER, C.Z.; CHRISTOFOLETTI, S.; SANTOS, C.S.; MEDEIROS, V.B.; SILVA, J.B.; SANTIAGO-HUSSEIN, M.C.; FERNANDES, R.S. **Geochemical**

**evidence of the 8.2 ka event and other Holocene environmental changes recorded in paleolagoon sediments, southeastern Brazil.** Quaternary Research, 77, 31–43. 2012.

SEUTIN, G.; White, B.N.; Boag P.T. **Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses.** Canadian Journal of Zoology 69, 82-90. 1991.

SILFVERGRIP, A.M.C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae).** Stockholm, Sweden, 1996. 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History. 1996.

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

STURMBAUER, C. **Explosive speciation in cichlid fishes of the African Great Lakes: a dynamic model of adaptive radiation.** Journal of Fish Biology, 53, 18–36. 1998.

STURMBAUER, C.; BARIC, S.; SALZBURGER, W.; RÜBER, L.; VERHEYEN, E. **Lake level fluctuations synchronize genetic divergences of cichlid fishes in African lakes.** Molecular Biology and Evolution, 18, 144–154. 2001.

SUGUIO, K.; MARTIN, L.; BITTENCOURT, A.C.S.P.; DOMINGUEZ, J.M.L.; FLEXOR, I.M.; AZEVEDO, A.E.G. **Flutuações do nível relativo do mar durante o Quaternário Superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira.** Revista Brasileira de Geociência, 15, 273-286. 1985.

WEBB, S. A.; GRAVES, J. A.; MACIAS-GARCIA, C.; MAGURRAN, A. E.; FOIGHIL, D. O.; RITCHIE, M. G. **Molecular phylogeny of the live bearing Goodeidae (Cyprinodontiformes).** Molecular Phylogenetics and Evolution, 30(3), 527-544. 2004.

WEITZMAN, S.H., MENEZES, N.A. & WEITZMAN, M. J. **Phylogenetic biogeography of the *Glandulocaudini* (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil.** In: Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns (Heyer, W.R. and Vanzolini P.E., eds.). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 379-427. 1988.

ZARDOYA, R.; DOADRIO, I. **Molecular Evidence on the Evolutionary and Biogeographical Patterns of European Cyprinids.** *J MolEvol*, 49, 227–237. 1999.