

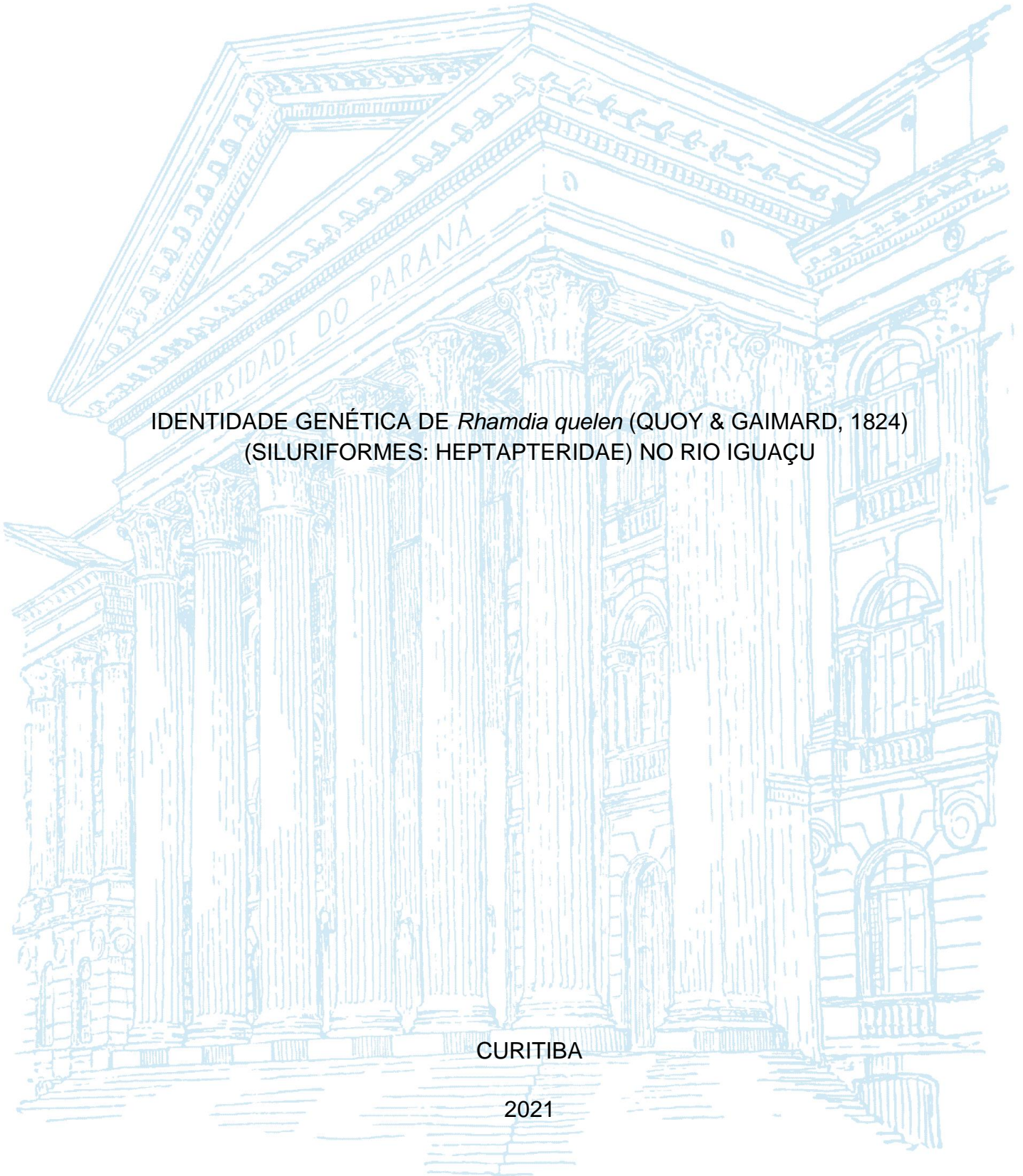
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMERSON FERNANDO GARCIA MACHADO

IDENTIDADE GENÉTICA DE *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824)
(SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) NO RIO IGUAÇU

CURITIBA

2021



EMERSON FERNANDO GARCIA MACHADO

IDENTIDADE GENÉTICA DE *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824)
(SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) NO RIO IGUAÇU

Trabalho apresentado ao curso de Ciências Biológicas, setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do diploma de graduando em ciências biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Walter Antonio Pereira Boeger

CURITIBA

2021

RESUMO

As espécies de *Rhamdia* estão distribuídas por toda a região Neotropical. Esse gênero de bagres apresentava cerca de 100 espécies até sua revisão taxonômica realizada por Silfvergrip em 1996, que sinonimizou muitas delas resultando em 11 espécies válidas. Posteriormente, diversos trabalhos demonstraram inconsistências na revisão levando à quebra de sinonimizações, resultando em 24 espécies válidas atualmente. Grande parte das discussões acerca da complexidade do gênero envolvem *Rhamdia quelen*, que possui 47 espécies nominais sob sinonímia. *Rhamdia quelen* está amplamente distribuída sendo encontrada do México à Argentina, inclusive em grande parte do Brasil e é reconhecida como um grande complexo de espécies. Para compreender os problemas envolvendo esse complexo, esse trabalho propõe testar a presença de diferentes linhagens de *Rhamdia quelen* em populações do Alto Rio Iguaçu utilizando os marcadores genéticos mitocondriais COI e CytB e comparar seus resultados com os dos marcadores microssatélites e dos dados de morfometria. Os grupos comparados foram inferidos a partir da filogenia Bayesiana do mtDNA e da análise de delimitação de espécies utilizando o bGMYC. A estrutura populacional a partir dos dados de sequência nuclear dos microssatélites foi inferida com o STRUCTURE, juntamente à Análise Discriminante dos Componentes Principais (DAPC). Os dados morfométricos foram submetidos a uma análise de componentes principais (PCA) e com as coordenadas dos indivíduos do gráfico de dispersão foram aplicados uma ANOVA e os Testes de Tukey. Os resultados suportaram três linhagens bem estruturadas e com alto grau de diferenciação para os dados de mtDNA. Os marcadores microssatélites sugerem dois ou três grupos com moderado nível de diferenciação e os dados de morfometria não forneceram evidência significativa de diferenciação entre os grupos.

INTRODUÇÃO

Rhamdia é um gênero de bagres neotropicais pertencentes à família Heptapteridae, com ampla distribuição, sendo encontrados desde o sul do México até o sul da Argentina (Silfvergrip, 1996; Daniels, 2019). Conhecidos no Brasil como jundiás, esses peixes apresentam um relativo destaque para a pesca esportiva e uma considerável relevância econômica para sistemas de piscicultura. Apesar de ser um gênero bastante estudado, sua sistemática tem sofrido extensos debates nas últimas décadas, não estando até hoje completamente resolvida (Vitule *et al.* 2009). O gênero, até então com aproximadamente 100 espécies descritas, foi revisado por Silfvergrip (1996), que então sinonimizou muitas delas, resultando em onze espécies. Foram constatadas inconsistências na revisão realizada por Silfvergrip (1996), o que levou à quebra da sinonimização realizada em *Rhamdia quelen*, por exemplo, e ao retorno da utilização de outras espécies como válidas (Angrizani, 2018), como foi o caso de *Rhamdia guatemalensis* e *Rhamdia cinerascens*, antes pertencentes à *R. quelen* mas validadas por Hernández *et al.* (2015). Atualmente, o gênero possui 24 espécies válidas (Froese & Pauly, 2019): *R. argentina*, *R. cinerascens*, *R. enfurnada*, *R. foia*, *R. guasarensis*, *R. guatemalensis*, *R. humilis*, *R. itacaiunas*, *R. jequitinhonha*, *R. laluchensis*, *R. laticauda*, *R. laukidi*, *R. macuspanensis*, *R. muelleri*, *R. nicaraguensis*, *R. parryi*, *R. poeyi*, *R. quelen*, *R. reddelli*, *R. saijaensis*, *R. schomburgkii*, *R. velifer*, *R. xetequepeque* e *R. zongolicensis*.

Dentre as principais espécies sinonimizadas dentro de *Rhamdia*, se destaca o jundiá ou bagre de água doce *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), resultado da sinonimização de 47 espécies das Américas Central e do Sul por Silfvergrip (1996). Apesar de ser considerada uma espécie válida, *R. quelen* possui grandes variações ecológicas e morfológicas entre suas populações (Ingenito & Buckup, 2007; Silva *et al.* 2012; Froese & Pauly, 2019; Silfvergrip, 1996; Angrizani & Malabarba, 2018), que possuem ampla distribuição nas bacias tropicais e subtropicais na América do Sul (Silfvergrip, 1996; Ingenito & Buckup, 2007). Silfvergrip (1996) reconhece a existência de grupos com características diferenciadas e distribuição restrita, porém não as considerou como outras espécies diferentes por também apresentarem semelhanças com outros morfotipos de *R. quelen* amplamente distribuídos. Por esses motivos a proposta de classificação de Silfvergrip (1996) tem sido frequentemente contestada (Perdices *et al.* 2002; Martinez *et al.* 2011; Valladão *et al.* 2018).

Avaliar presença de diferentes linhagens nas populações de *R. quelen* é essencial para definir sua taxonomia e elaborar estratégias de conservação devido à sua utilização como espécie modelo em estudos de ecotoxicologia (Gluszczak *et al.* 2007; Kreutz, *et al.* 2008; Ferreira *et al.* 2010) e à sua relevância cultural e econômica (Loureiro *et al.* 2013), visto que é o 14º peixe de água doce de importância comercial para a piscicultura brasileira (MPA, 2013). Um ponto que demonstra a importância no estudo da estrutura populacional da espécie é o fato de sua utilização na aquicultura em boa parte da América do Sul, inclusive no Brasil (Scaranto *et al.* 2018). Os possíveis cruzamentos interespecíficos ameaçam a integridade genética e o potencial de sobrevivência de populações selvagens da espécie através da formação de híbridos (Allendorf *et al.* 2010; Hashimoto *et al.* 2016).

Marcadores genéticos são uma alternativa para resolver os problemas taxonômicos em *R. quelen*, visto que não existem bons caracteres morfológicos diagnósticos da espécie (Perdices *et al.* 2002). Diferentes estudos têm evidenciado grandes divergências genéticas entre populações, com ausência de diferenciação morfológica (Perdices *et al.* 2002; Garcia *et al.* 2010; Martinez, 2011; Scaranto *et al.* 2018; Ríos *et al.* 2019), o que é forte indicativo da presença de um complexo de espécies crípticas em *R. quelen* (Garcia *et al.* 2009; Angrizani & Malabarba, 2018; Scaranto *et al.* 2018; Ríos *et al.* 2017, 2020). Especificamente, Perdices *et al.* (2002) indica a existência de dois grupos na América Central e América do Sul em análise de DNA mitocondrial, sendo os grupos cisandino e transandino evolutivamente distintos. Similarmente, trabalhos de Garcia *et al.* (2003, 2010) indicam grande variação em macroestrutura de cariótipo entre as populações do sul e sudeste do Brasil. Da mesma forma, Ríos *et al.* (2017) identificou pelo menos seis linhagens mitocondriais em ocorrência na bacia do Prata e no sistema lagunar Patos-Mirim. Angrizani & Malabarba (2020) sugerem que existam pelo menos 18 possíveis espécies no clado cisandino de *R. quelen*.

R. quelen é uma espécie com ampla representação na bacia do Rio Iguaçu e estudos cariotípicos, morfométricos e genéticos indicam a existência de diferenciação entre suas populações (Fenocchio *et al.* 2003; Garcia *et al.* 2010; Garavello & Shibatta, 2016) no local. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo testar a presença de diferentes linhagens de *R. quelen* em populações dos municípios de São Mateus do Sul e Lapa, pertencentes à bacia do Alto Rio Iguaçu, utilizando marcadores

genéticos mitocondriais e se suas identidades são compatíveis com marcadores nucleares e dados morfométricos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta dos Animais

Cinquenta e três espécimes de *Rhamdia quelen* foram coletados no Rio Iguaçu, nas cidades de Lapa (25° 47'40" S, 50° 11' 54" W) - 43 indivíduos - e São Mateus do Sul (25° 53' 24" S, 50° 25' 54" W) - 10 indivíduos - entre dezembro de 2005 e julho de 2006. Amostras de músculo e brânquias dos espécimes foram fixados em solução hipersalina com DMSO-EDTA (Seutin *et al.* 1991) para análises moleculares, e o restante do corpo foi fixado em formol 10% para identificação e análises morfológicas.

Procedimentos genéticos

O DNA genômico das amostras foi extraído com o Kit EZ-DNA (Biological Industries) de acordo com o protocolo do fabricante. Os genes mitocondriais Citocromo B (CytB) e Citocromo C Oxidase I (COI) foram amplificados utilizando os primers GluDG.L (Palumbi *et al.* 1991) e H16460 (Perdices & Doadrio, 2001), e HCO e LCO (Folmer *et al.* 1994), respectivamente. As reações de amplificação (PCR) foram preparadas com 60 ng de DNA, 1,5 µL de MgCl₂ 50mM, 0,4 µL de solução de dNTPs 25 mM, 2,5 µL de Thermophilic Buffer 10x, 0,5 µL de Taq polymerase, 1 µL de cada primer a 50 pmoles, água ultrapura para completar 25µL de reação. As condições das reações do Citocromo B foram as seguintes: um ciclo de desnaturação e ativação da enzima por 4 minutos a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 45 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 59 °C para anelamento dos primers e 30 segundos a 72°C para extensão. A reação foi finalizada com um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72 °C. O programa de PCR para o fragmento de COI compreendeu um ciclo de desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 59°C e 30 segundos a 72°C, e um ciclo para extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit MinElute (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. A reação de sequenciamento do DNA foi

realizada utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), seguindo o protocolo do fabricante. O produto da reação de sequenciamento foi purificado através de precipitação com Sephadex G-50 Medium (GE Healthcare) e sequenciado em sequenciador automático ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). As sequências foram editadas no BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) e alinhadas no software online MAFFT (Kato *et al.* 2019).

Oito pares de primers de microssatélites foram comercialmente desenvolvidos (Tabela 1), para avaliar o fluxo gênico entre as linhagens de *R. quelen* do Rio Iguaçu. As reações de microssatélites foram preparadas com 2 ng de DNA, 0,4 µl de MgCl₂ 50mM, 0,8 µl de solução de dNTPs 25mM, 1,0 µl de Thermophilic Buffer 10x, 0,05 µl de Taq polymerase, 0,3 µl de cada primer a 20 pmoles, e água ultrapura até completar 10µl de reação. As condições das reações foram as seguintes: desnaturação e ativação da enzima por 3 minutos a 94°, 35 ciclos de 40 segundos a 94°C para desnaturação, 40 segundos utilizando temperaturas específicas de acordo com a tabela 1 para anelamento e 30 segundos a 72°C, e extensão final de 60 minutos a 72 °C. Os microssatélites foram genotipados em um sequenciador automático ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) e seus alelos definidos no software GeneMarker 2.4.2 (Holland & Parson, 2011).

TABELA 1 - PRIMERS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES, SUAS SEQUÊNCIAS, SEUS TAMANHOS DOS FRAGMENTOS E SUAS TEMPERATURAS DE ANELAMENTO (T_m), UTILIZADOS PARA A AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DAS LINHAGENS DE *R. QUELEN* DO RIO IGUAÇU.

Primer	Sequência	Tamanho do Fragmento	T _m
Rh A2-F	5'- GTG GCA ATG CTG ATT GTA ATG -'3	154pb	59,1
Rh A2-R	5'- GGC AAG AGC TGA GAA CCA TAG -'3	154pb	59,1
Rh B1A-F	5'- AAC GAG AGG AGC CAT CAG AC -'3	146pb	59,4
Rh B1A-R	5'- AGG AGG AGA GCA GAA TGT GC -'3	146pb	59,6
Rh A101-F	5'- AAA CGT CAT AAC ACT CAC TGC -'3	248pb	55,4
Rh A101-R	5'- TAC CCA AGT ACA CCT CGT ATG -'3	248pb	55,2
Rh A111-F	5'- GAC CGA GAC TGC TGA CTG TC -'3	138pb	57,5
Rh A111-R	5'- CGA GCG AGA CGA TTC TTT AC -'3	138pb	56,9
Rh B106-F	5'- ACC GCT ATC ACG AGT GTA ACC -'3	213pb	59,1
Rh B106-R	5'- CGG AAT GGA GAA AGT TTG TTG -'3	213pb	59,6

Rh C108-F	5'- ATT TTG TGG GTA GTT TTA CTG C -'3	214pb	55,2
Rh C108-R	5'- CGG TTC TGT TTA TTG GTC AC -'3	214pb	55,6
Rh D109-F	5'- AGC AGC ATT TTC TAC CAC AG -'3	266pb	55,7
Rh D109-R	5'- ATC GAA CCC AGG TTA AGA AC -'3	266pb	55,7
Rh D117-F	5'- CGC CAG ACA TTT ACA GAC TTC -'3	345pb	57,5
Rh D117-R	5'- GCC AGA CTT ACA GCA TAG TGG -'3	345pb	57,5

Análises moleculares

As análises filogenéticas dos dados de mtDNA concatenados foram conduzidas no software BEAST 1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018), utilizando quatro corridas independentes de 100 milhões de gerações amostrando a cada 10 mil, e 10% de *burn-in*. Os modelos de substituição foram selecionados de acordo com o software jModeltest 2.1.10 (Darriba *et al.* 2012) baseados no Critério de Informação Bayesiana (BIC) (Schwarz, 1978). Como grupo externo, foram selecionadas sequências de *Rhamdia guatemalensis* para ambos os genes, identificação do Genbank AY036670, AY036671 e AY036672 – Citocromo B – e JN313619, JN313620 e JN313621 – Citocromo Oxidase I.

Adicionalmente uma análise de delimitação de espécies utilizando o modelo bGMYC, uma implementação Bayesiana do modelo General Mixed Yule Coalescent) (Reid & Carstens, 2012) foi realizada a partir de 1000 árvores, obtidas no BEAST, com uma corrida MCMC de 50000, *burn-in* de 40000 e amostragem a cada 100 para cada árvore através do pacote “bGMYC” (Reid & Carstens, 2012) no R versão 3.6.3 (R Core Team, 2020).

As análises comparativas entre os grupos, tanto para dados de sequência mitocondrial, marcadores microssatélites e morfometria, foram realizadas tomando como base as três linhagens definidas pela filogenia, com exceção de três indivíduos (008L, 009L e 037L) que foram delimitados como espécies putativas diferentes e, portanto, retiradas de todas as análises comparativas pelo fato de ser impossível realizar análises entre populações que contenham apenas um indivíduo. A utilização de marcadores microssatélites nucleares e dados de morfometria na comparação das linhagens obtidas filogeneticamente através do mtDNA foi utilizada para confirmar a

existência desses grupos com dados derivados de diferentes características da espécie.

Os números de haplótipos e de sítios polimórficos foram calculados com o pacote “pegas” (Paradis, 2010) no ambiente computacional R versão 4.0.4 (RcoreTeam, 2021). O índice de fixação genética (F_{st}) e a implementação do modelo estatístico de análise de variância molecular (AMOVA), ambos cruciais para o entendimento das relações entre populações de uma espécie, juntamente aos testes de neutralidade D de Tajima e F_s de F_u foram realizados através do software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), separando as populações nos grupos resultantes da filogenia gerada a partir da concatenação dos fragmentos mitocondriais de COI e CytB. Redes de haplótipos para cada gene foram construídas no PopART (Leigh & Bryant, 2015) utilizando o método *Median-Joining* (Bandelt *et al.* 1999).

Os valores de p dos testes de diferenciação genética (F_{st}) foram corrigidos utilizando o método B-Y, com o objetivo de reduzir a possibilidade de falsos positivos nos testes de comparação múltiplas de hipótese (Benjamini & Yekutieli, 2001; Narum, 2006).

Microssatélites

A presença de alelos nulos nos dados de microssatélites foi testada utilizando o software Micro-Checker 2.2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004). Com o objetivo de minimizar os efeitos de alelos nulos que foram verificados, os dados foram agrupados em duas abordagens: D1, que contém todos os loci com exceção do D117, e D2 que compreende os loci A2, A111, B1A e D109. Essa escolha foi feita com base na alta frequência de alelos nulos nos alelos A101, B106, C108 e D117 em pelo menos dois dos três grupos inferidos pela filogenia e a análise de delimitação de espécies com bGMYC.

A contagem do número de alelos e alelos exclusivos, juntamente ao cálculo de riqueza alélica de cada linhagem foram obtidos por meio do pacote “PopGenReport” (Adamack & Gruber, 2014) no R versão 4.0.4 (RStudio Team, 2021). Testes de desequilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação, e análises de diversidade gênica, AMOVA, diferenciação genética (F_{st}) e endogamia (F_{is}) foram conduzidos utilizando o Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) tomando como populações os

grupos definidos pela análise filogenética e de delimitação de espécies com o modelo bGMYC.

A estrutura populacional foi inferida através do software Structure 2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000), utilizando 4 corridas independentes com 5 milhões de gerações e 10% de *burn-in*, para valores $1 < K < 5$ com o modelo LOCPRIOR, com base nos grupos definidos pela filogenia e pela análise de delimitação de espécies. O provável valor de K foi determinado utilizando o Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012) com o protocolo de Evanno *et al.* (2005). Através do pacote “adegenet” (Jombart, 2008) no software R versão 4.0.4 (RStudio Team, 2021), foi aplicada a Análise Discriminante dos Componentes Principais (DAPC) para identificar e diferenciar geneticamente os grupos de indivíduos.

Os valores de p dos testes de desequilíbrio de ligação, diferenciação genética (Fst) e endogamia (Fis) foram corrigidos utilizando o método B-Y, com o objetivo de reduzir a possibilidade de falsos positivos nos testes de comparação múltiplas de hipótese (Benjamini & Yekutieli, 2001; Narum, 2006).

Análises Morfométricas

As 36 características utilizadas por Silfvergrip (1996) e Geerinckx *et al.* (2004) foram mensuradas para os 53 espécimes de *Rhamdia quelen* coletados: comprimento padrão (SL), distância interpectoral (IPcD), distância interpélvica (IPvD), altura corporal máxima (MxBH), comprimento predorsal (PDL), distância interdorsal-base caudal (IDCbD), distância interdorsal-adiposa (IDAdD), comprimento pré-peitoral (PPcL), comprimento pré-pélvico (PPvL), comprimento pré-anal (PAnL), distância interpélvico-anal (IPvAD), distância barbatana adiposa-barbatana caudal (AdCID), altura mínima do pedúnculo caudal (MnCPH), comprimento da nadadeira pélvica (PvFL), comprimento da base da nadadeira anal (AFbL), comprimento da nadadeira anal (AFL), comprimento da base da nadadeira dorsal (DFBL), comprimento da nadadeira dorsal (DFL), comprimento do espinho da barbatana dorsal (DSL), comprimento do espinho da nadadeira peitoral (PcSL), comprimento da nadadeira adiposa (AdFL), comprimento da cabeça (HL), comprimento da cabeça pré-orbital (PrOL), altura da cabeça orbital (OHH), altura da cabeça (HH), diâmetro do orbital (OD), distância interorbital (IOD), largura da boca (MW), largura da placa dentária pré-maxilar (PmxTW), comprimento da placa de dentes pré-maxilar (PmxTL), largura da

placa de dentes mandibular (MTW), comprimento da placa de dentes mandibular (MTL), interdistância dos barbilhos mandibulares (MxBID), interdistância das narinas anteriores (ANID), interdistância anteroposterior das narinas (APNI), distância narina-pré-orbital posterior (PNOD). Todas as medições foram feitas em distâncias lineares usando um paquímetro manual de precisão de 0,05 mm.

Os dados de morfometria dos espécimes de *R. quelen* foram padronizados (média 0 e desvio padrão 1) e submetidos a uma análise de componentes principais (Bookstein, 1985) no R versão 4.0.4 (RcoreTeam, 2021), utilizando os pacotes “FactoMineR” (Sebastien *et al.* 2008) e “factoextra” (Kassambara & Mundt, 2020). A comparação entre os grupos, definidos a partir da análise filogenética, foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando as coordenadas dos três primeiros componentes da PCA e adicional utilização do teste de Tukey (Miller, 1981) para comparação dos grupos.

RESULTADOS

Sequências mitocondriais

Um total de 53 amostras de espécimes de *Rhamdia quelen* coletados na bacia do Alto Rio Iguaçu geraram um alinhamento de 1410 pb para sequências de mtDNA, sendo 572 pb do gene COI e 838 pb do gene CytB, concatenadas. Foram identificados 48 sítios polimórficos, resultando em 37 haplótipos, diversidade haplotípica de 0,982 e diversidade nucleotídica de 0,013.

A análise filogenética evidenciou a presença de três linhagens de *R. quelen* no Alto Rio Iguaçu, com altos valores de suporte de probabilidade posterior (figura 1), que foram tomados como base para as análises de comparação, inclusive para os dados de microssatélites e morfometria.

A análise de delimitação de espécies com o modelo bGMYC utilizando valor de corte da probabilidade posterior em 0,9 resultou na inferência de seis grupos candidatos a espécies (figura 1), sendo um deles exatamente correspondente ao grupo inferido a partir da filogenia Bayesiana (linhagem A) e três deles correspondendo às amostras 008L, 009L e 037L, que foram definidas como sendo

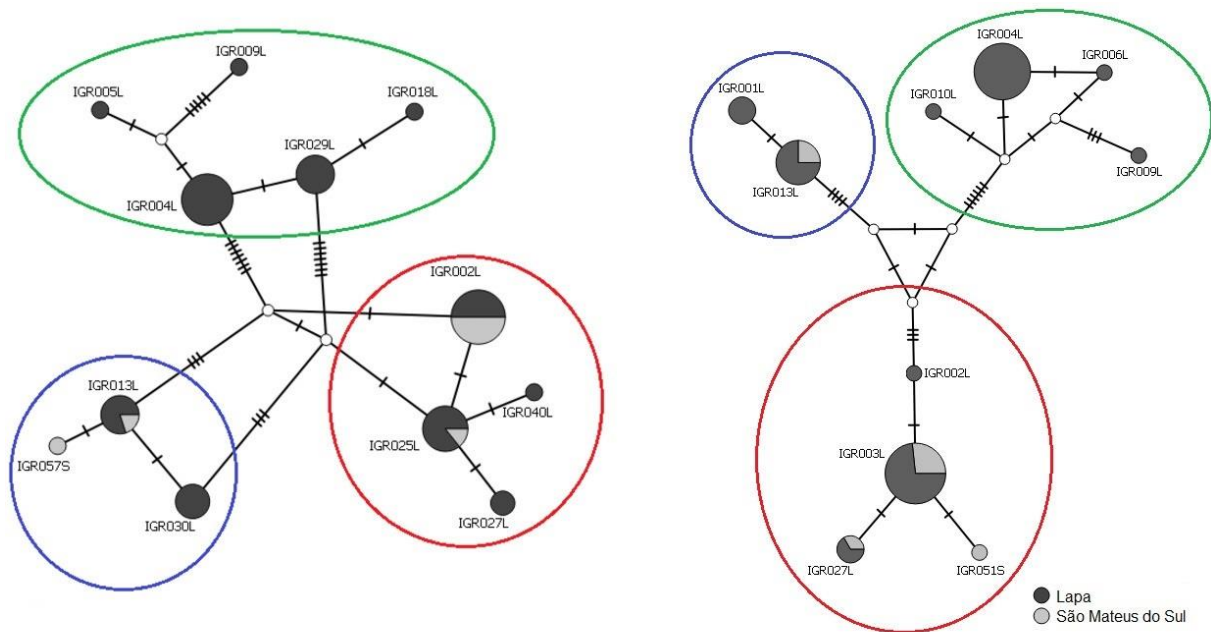


FIGURA 2 – REDES DE HAPLÓTIPOS GERADAS POR MEDIAN JOINING A PARTIR DOS MARCADORES MITOCONDRIAIS COI (ESQUERDA) E CYTB (DIREITA) DE POPULAÇÕES DE SÃO MATEUS DO SUL (S) E LAPA (L) DE *R. quelen* DO ALTO RIO IGUAÇU. GRUPOS PREVIAMENTE DEFINIDOS PELA FILOGENIA E PELA ANÁLISE DE DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES UTILIZANDO O MODELO BGMYC DESTACADOS: A - AZUL, B - VERMELHO E C - VERDE.

Os testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu resultaram em valores negativos e estatisticamente significantes para todas as populações amostradas, indicando uma possível expansão populacional recente nos grupos (tabela 2). A AMOVA indicou que a maior variabilidade genética foi encontrada entre as populações – linhagens A, B e C – (91,53%) e uma menor parcela (8,47%) representando a variabilidade intrapopulacional. O valor de Fst global foi de 0,91 e os valores de Fst pareados das linhagens foram significativos, reforçando a diferenciação genética dos grupos (tabela 3).

TABELA 2 - DIVERSIDADE GENÉTICA E TESTES DE NEUTRALIDADE DO ALINHAMENTO CONCATENADO DAS SEQUÊNCIAS MITOCONDRIAIS DE COI E CYTB DAS POPULAÇÕES DE *R. quelen* DE SÃO MATEUS DO SUL E LAPA DO ALTO RIO IGUAÇU. N = NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS, H = NÚMERO DE HAPLÓTIPOS ENCONTRADO, S = NÚMERO DE SÍTIOS POLIMÓRFICOS, DH = DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA, π = DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA. VALORES DOS TESTES DE NEUTRALIDADE EM NEGRITO SIMBOLIZAM VALORES DE P SIGNIFICATIVOS.

	N	H	S	DH	π	D de Tajima	Fs de Fu
A	12	10	13	0,955	0,0017	-1,842	-12,988
B	22	17	21	0,970	0,0015	-2,333	-26,952
C	16	10	14	0,892	0,0014	-2,099	-22,735
TOTAL	50	37	48				

TABELA 3 - VALORES DE FST RESULTANTES DA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DEFINIDOS A PARTIR DA FILOGENIA DAS POPULAÇÕES DE *R. quelen* DO ALTO RIO IGUAÇU. VALORES DE P AJUSTADOS COM O MÉTODO B-Y (BENJAMINI & YEKUTIELI, 2001) ACIMA DA DIAGONAL EM NEGRITO.

	A	B	C
A		0,000	0,000
B	0,895		0,000
C	0,928	0,920	

Marcadores Microssatélites

Foram analisadas 49 amostras para 8 loci inicialmente, divididas em três grupos com base na filogenia. Alelos nulos foram constatados nos loci: D117 nas três populações; B106 e C108 em A e B; e A101 e D109 apenas em B. Por esse motivo foram utilizadas duas abordagens para análise dos dados de microssatélites. Uma abordagem mais conservadora (D2) em que foram retirados quatro loci (A101, B106, C108 e D117) que apresentaram alta frequência de alelos nulos em pelo menos dois dos três grupos inferidos pela filogenia e análise de delimitação de espécies. Visto que o baixo número de loci da primeira poderia limitar os resultados das análises, utilizou-se de uma segunda abordagem (D1) retirando apenas um locus (D117) com alta frequência de alelos nulos nos três grupos inferidos.

As populações apresentaram significativos desequilíbrio de Hardy-Weinberg em ambas as abordagens em metade dos loci analisados, como evidenciado na tabela 4. Após as correções dos valores de p (Benjamini & Yekutieli, 2001) foram constatados desequilíbrios de ligação nos dados da abordagem D1 nos pares de loci A2/A111 do grupo B e B106/C108 do grupo C. A abordagem D2 apresentou valores corrigidos de p significativos para desequilíbrio de ligação no par de loci A2/A111 do grupo B.

O maior número de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg na abordagem D1 pode ser explicado pela possível presença de alelos nulos. Por esse motivo foi utilizada uma segunda abordagem em adição à primeira com número menor de loci apresentando alelos nulos, com o objetivo de complementar as análises, visto que se fosse empregada apenas a abordagem D2, o pequeno número de loci poderia causar um viés no estudo.

TABELA 4 - VALORES DE HETEROZIGOSIDADE DAS TRÊS LINHAGENS INFERIDAS COM BASE NA FILOGENIA DAS POPULAÇÕES DE *R. quelen* DO ALTO RIO IGUAÇU. NÚMEROS EM NEGRITO REPRESENTAM DESVIOS DO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG. OS LOCI PERTENCENTES AO GRUPO DE DADOS D2 (A2, A111, B1A E D109) FORAM DESTACADOS EM NEGRITO.

Locus	A		B		C	
	Obs. Het	Exp. Het	Obs. Het	Exp. Het	Obs. Het	Exp. Het
A2	0,92	0,82	0,64	0,63	0,53	0,62
A101	0,70	0,88	0,60	0,79	0,29	0,70
A111	1,00	0,91	0,77	0,83	0,80	0,88
B1A	0,83	0,84	0,73	0,74	0,86	0,91
B106	0,92	0,82	0,41	0,67	0,18	0,54
C108	0,42	0,50	0,36	0,67	0,00	0,57
D109	0,78	0,72	0,48	0,83	0,69	0,90

Os valores de Fis não foram significativos em ambas as abordagens, com exceção da população B, que demonstrou significativo nível de endogamia. Todas as populações apresentaram grande número de alelos exclusivos, com destaque para a população C. (tabelas 5 e 6)

TABELA 5 - DIVERSIDADE ALÉLICA DOS DADOS DE MICROSSATÉLITES DA ABORDAGEM D1 DOS GRUPOS DE *R. quelen* DO ALTO RIO IGUAÇU DEFINIDOS A PARTIR DA FILOGENIA. N: NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS POR LOCUS; A: NÚMERO DE ALELOS; Exc: NÚMERO DE ALELOS EXCLUSIVOS; pExc: PROPORÇÃO DE ALELOS EXCLUSIVOS NA POPULAÇÃO; RA: RIQUEZA ALÉLICA E DG: DIVERSIDADE GÊNICA. VALORES DE FIS EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA DO VALOR DE P, QUE FORAM AJUSTADOS COM BASE NO MÉTODO B-Y (BENJAMINI & YEKUTIELI, 2001).

	N	A	Exc	pExc	RA	DG	FIS
A	12	52	9	17,3%	5,66	0,70	-0,07
B	22	56	10	17,8%	4,96	0,71	0,21
C	15	48	13	27,1%	4,98	0,58	0,18

TABELA 6 - DIVERSIDADE ALÉLICA DOS DADOS DE MICROSSATÉLITES DA ABORDAGEM D2 DOS GRUPOS DE *R. quelen* DO ALTO RIO IGUAÇU DEFINIDOS A PARTIR DA FILOGENIA. N: NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS POR LOCUS; A: NÚMERO DE ALELOS; Exc: NÚMERO DE ALELOS EXCLUSIVOS; pExc: PROPORÇÃO DE ALELOS EXCLUSIVOS NA POPULAÇÃO; RA: RIQUEZA ALÉLICA E DG: DIVERSIDADE GÊNICA. VALORES DE FIS EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA DO VALOR DE P, QUE FORAM AJUSTADOS COM BASE NO MÉTODO B-Y (BENJAMINI & YEKUTIELI, 2001).

	N	A	Exc	pExc	RA	DG	FIS
A	12	32	4	12,5%	6,61	0,74	-0,13
B	22	40	9	22,5%	6,36	0,74	0,13
C	15	39	12	30,8%	7,33	0,74	0,06

Os valores de Fst globais observados para os dados de microssatélites nas abordagens D1 e D2 foram de 0,036 e 0,076, respectivamente. O Fst pareado das populações demonstrou maior distância de C em relação a A e B (tabelas 7 e 8).

TABELA 7 - VALORES DE FST DO CONJUNTO DE DADOS D1 RESULTANTES DA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DE *R. quelen* DO ALTO RIO IGUAÇU DEFINIDOS A PARTIR DA FILOGENIA. VALORES DE P AJUSTADOS COM O MÉTODO B-Y (BENJAMINI & YEKUTIELI, 2001) NA PORÇÃO SUPERIOR DIREITA EM NEGRITO.

	A	B	C
A		0,0083	0,0000
B	0,0319		0,0070
C	0,0583	0,0389	

TABELA 8 - VALORES DE FST DO CONJUNTO DE DADOS D2 RESULTANTES DA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DE *R. quelen* DO ALTO RIO IGUAÇU DEFINIDOS A PARTIR DA FILOGENIA. VALORES DE P AJUSTADOS COM O MÉTODO B-Y (BENJAMINI & YEKUTIELI, 2001) NA PORÇÃO SUPERIOR DIREITA EM NEGRITO.

	A	B	C
A		0,0139	0,0000
B	0,0300		0,0000
C	0,0975	0,1023	

A AMOVA dos dados de microssatélites (tabela 9) retornou uma maior variação entre os indivíduos nas duas abordagens, porém com divergências nas variações entre populações (3,65% para D1 e 7,62% para D2) e entre indivíduos das populações (12,74% para D1 e 4,84% para D2). Tornando A e B um único grupo e comparando-o a C trouxe leve diferença na análise, com exceção de D2*, que exibiu maior variação entre as populações em comparação com D2.

TABELA 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) DOS MICROSSATÉLITES DE AMBAS AS ABORDAGENS UTILIZADAS COM OS TRÊS GRUPOS DE *R. quelen* DO ALTO RIO IGUAÇU, DEFINIDOS COM BASE NAS LINHAGENS ESTABELECIDAS PELA FILOGENIA DOS DADOS DE SEQUÊNCIA MITOCONDRIAL (D1 E D2) E COM DOIS GRUPOS (D1* E D2*), JUNTANDO A E B COMO UM GRUPO DIFERENTE DE C.

	D1	D1*	D2	D2*
Entre populações	3,65%	3,03%	7,62%	9,25%
Entre indivíduos das populações	12,74%	13,76%	4,84%	5,57%
Entre indivíduos	83,60%	83,21%	87,54%	85,17%

O método *ad-hoc* de Evanno (2005), a partir dos resultados do STRUCTURE, suporta que o valor mais provável de K é 2 para as duas abordagens indicando, portanto, dois grupos geneticamente distintos, porém com mistura genética. Ambas as abordagens suportam as linhagens A e B como um grupo geneticamente diferente da linhagem C (figura 3). A abordagem D2 acentua bem essa diferenciação do grupo C.

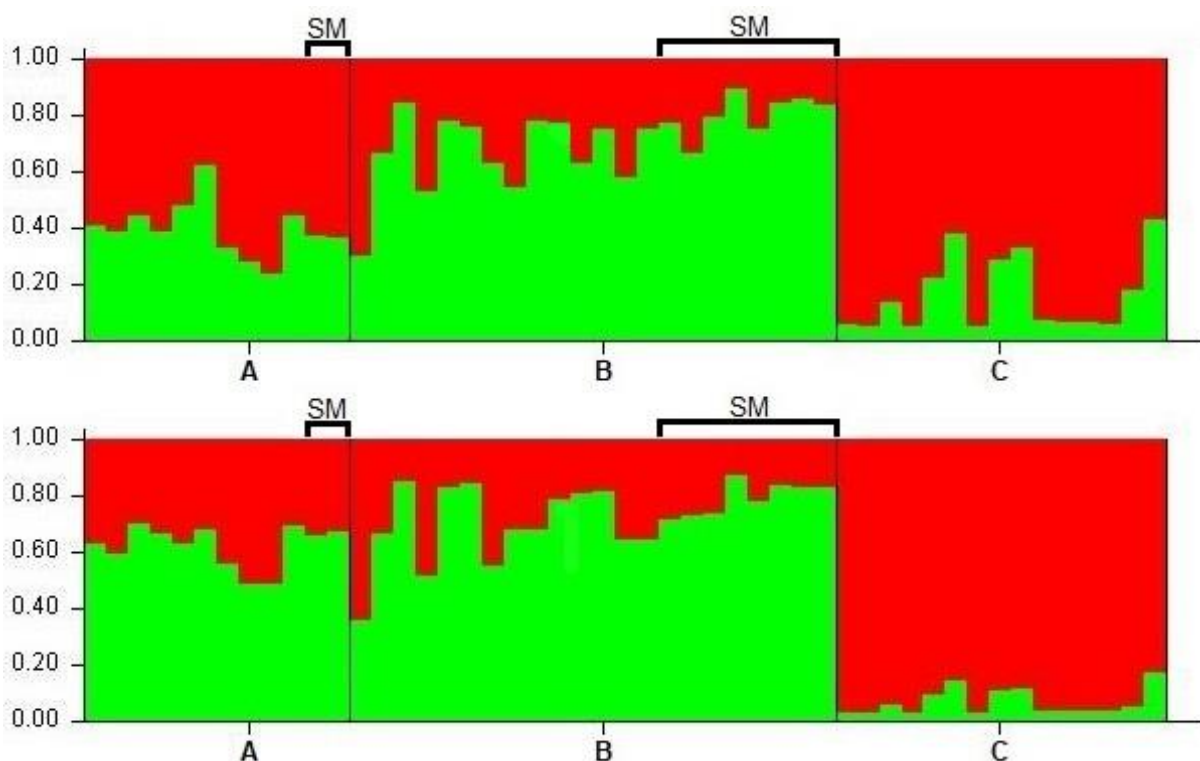


FIGURA 3 - RESULTADO DA ANÁLISE NO STRUCTURE DOS INDIVÍDUOS DE *R. quelen* COLETADOS NO ALTO RIO IGUAÇU, DOS CONJUNTOS DE DADOS DE MICROSSATÉLITES D1 (ACIMA) E D2 (ABAIXO). GRUPOS A, B E C DEFINIDOS COM BASE NA FILOGENIA. AS CORES INDICAM PERTENCIMENTO DOS INDIVÍDUOS AOS AGRUPAMENTOS GENÉTICOS. INDIVÍDUOS COLETADOS EM SÃO MATEUS DO SUL ESTÃO IDENTIFICADOS (SM).

O Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012) utilizando o método de Evanno (2005) retornou um número de clusters genéticos de K=2, tanto para D1 quanto D2. Com base nesse número de clusters, foi realizada uma análise discriminante de componentes principais (DAPC). Observou-se um padrão similar nos dois conjuntos de dados de microsatélites (figura 4), que converge com os resultados obtidos a partir do STRUCTURE, em que a população C se mostrou geneticamente diferente das populações A e B.

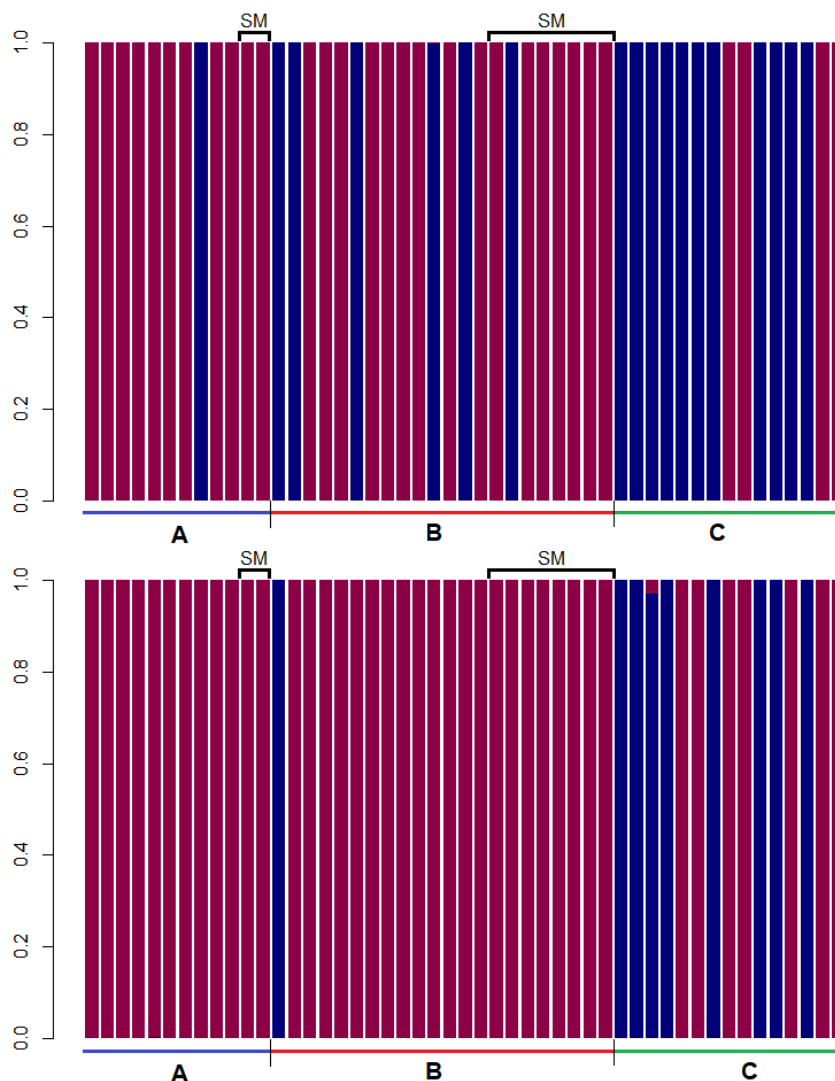


FIGURA 4 - ANÁLISE DISCRIMINANTE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (DAPC) DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES DAS ABORDAGENS D1 (ACIMA) E D2 (ABAIXO) DOS INDIVÍDUOS DE *R. quelen* COLETADOS NO ALTO RIO IGUAÇU. AS CORES NO GRÁFICO INDICAM PROBABILIDADE DE PERTENCIMENTO DOS INDIVÍDUOS AOS AGRUPAMENTOS QUE ESTÃO SINALIZADOS NA PORÇÃO INFERIOR DA FIGURA. INDIVÍDUOS COLETADOS EM SÃO MATEUS DO SUL ESTÃO IDENTIFICADOS (SM).

Morfometria

A partir dos dados padronizados das medidas dos 50 espécimes utilizados foi realizada a análise de componentes principais (PCA) e, com base nela, foram gerados os gráficos de dispersão das amostras de *R. quelen* (figuras 5 e 6). Os três primeiros componentes principais representaram 95,6% da variabilidade total, sendo que o primeiro e segundo componentes explicam 91,9% e 2,2% respectivamente. As contribuições das variáveis para o componente 1 foram muito semelhantes, sendo a maior parte delas em torno de 3% como demonstrado na tabela no anexo I. O componente 2 apresentou maior contribuição das medidas da largura da placa de dentes mandibular (MTW) – aproximadamente 68,4% – e o componente 3 das

medidas da distância das nadadeiras interdorsal-adiposa (IDAdD) – aproximadamente 67,1%.

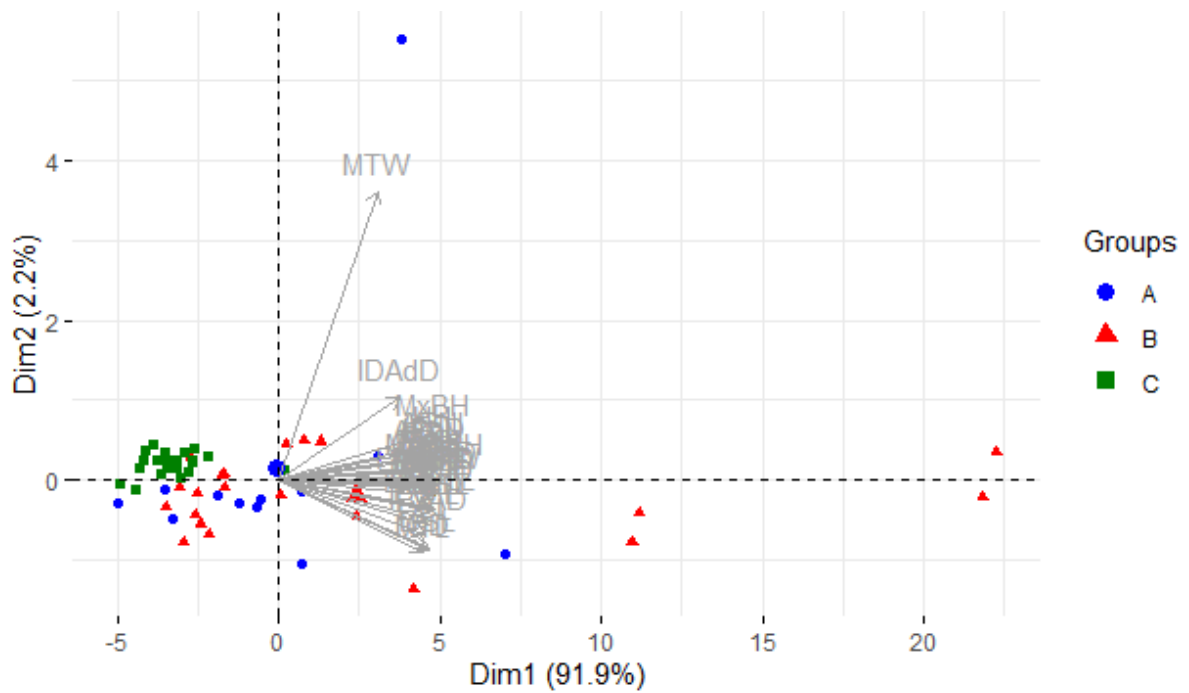


FIGURA 5 - ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS 1 E 2 DOS DADOS DE MORFOMETRIA DE *R. quelen* DO RIO IGUAÇU. LINHAGENS A, B E C DEFINIDAS ATRAVÉS DA FILOGENIA E DIFERENCIADAS PELAS CORES INDICADAS NA LEGENDA DA FIGURA.

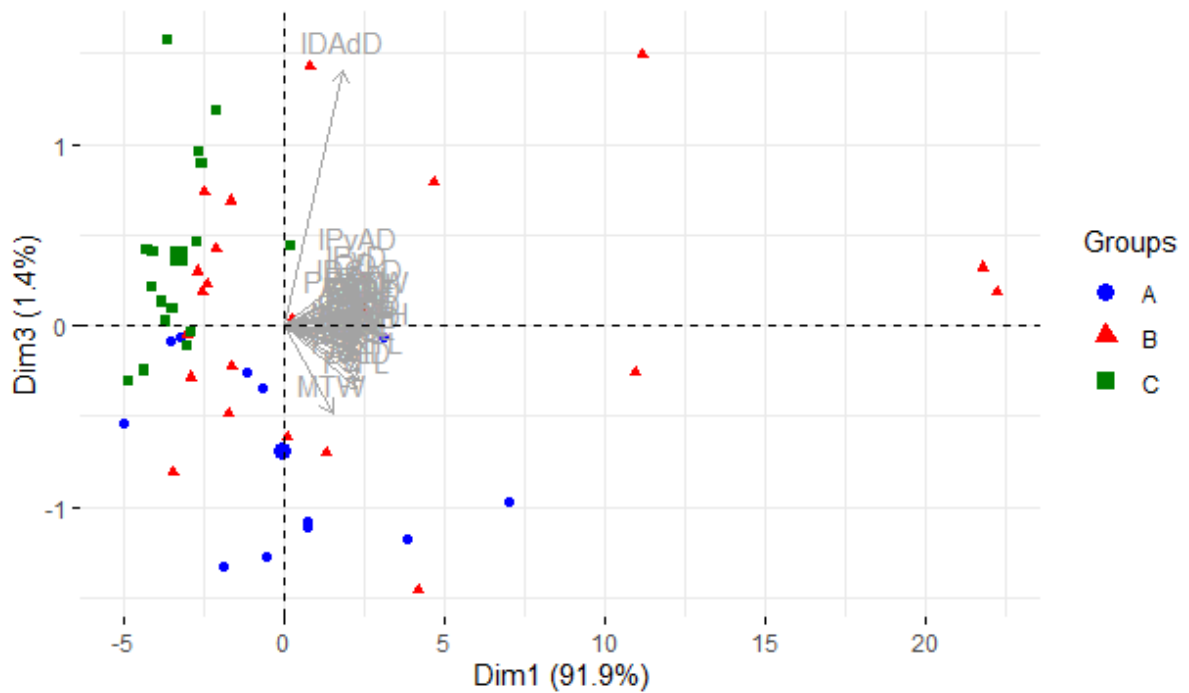


FIGURA 6 - ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS 1 E 3 DOS DADOS DE MORFOMETRIA DE *R. QUELEN* DO RIO IGUAÇU. LINHAGENS A, B E C DEFINIDAS ATRAVÉS DA FILOGENIA E DIFERENCIADAS PELAS CORES INDICADAS NA LEGENDA DA FIGURA.

Não foi observada grande diferenciação das linhagens a partir dos gráficos de dispersão da análise dos componentes principais dos dados de morfometria de *R. quelen* do Rio Iguaçu, com exceção da linhagem C que ficou restrita a um pequeno agrupamento enquanto A e B ficaram dispersas (figura 5).

A análise de variância, que foi realizada a partir das coordenadas da PCA (tabela 10), demonstrou uma variância significativa entre os grupos para o componente 3. A aplicação do teste de comparação de médias de Tukey não apontou diferenciação significativa entre os grupos para nenhum dos três primeiros componentes da PCA (tabela 11).

TABELA 10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REALIZADA A PARTIR DAS COORDENADAS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DOS DADOS DE MORFOMETRIA DE *R. quelen* DO ALTO RIO IGUAÇU. VALORES DE P SIGNIFICATIVOS DA ESTATÍSTICA F DESTACADOS EM NEGRITO.

	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor de p
Componente 1	96,40	48,21	0,244
Componente 2	1,19	0,59	0,491
Componente 3	3,35	1,67	0,037

TABELA 11 - TESTE DE TUKEY PARA COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS OBTIDAS PELA ANOVA DAS COORDENADAS DA PCA DOS DADOS MORFOMÉTRICOS DE *R. quelen* DO ALTO RIO IGUAÇU, SEUS VALORES DE DIFERENÇA E INTERVALOS INFERIORES E SUPERIORES DA DIFERENÇA.

	Tukey	Diferença	Inf	Sup	Valor de p
Componente 1	A-B	-2,394	-7,395	2,606	0,483
	A-C	0,063	-4,687	5,955	0,955
	B-C	3,029	-1,549	7,607	0,255
Componente 2	A-B	-0,071	-0,858	0,716	0,973
	A-C	-0,371	-1,208	0,467	0,536
	B-C	-0,299	-1,020	0,421	0,577
Componente 3	A-B	0,518	-0,080	1,118	0,101
	A-C	-0,004	-0,641	0,633	0,999
	B-C	-0,52	-1,071	0,025	0,064

DISCUSSÃO

A filogenia construída a partir dos dados de mtDNA indica a existência de três grupos bem estruturados geneticamente com alto grau de diferenciação que foram corroborados com a construção das redes de haplótipos, apresentando um valor de F_{ST} global de 0,91. A análise de delimitação de espécies utilizando modelo bGMYC reforçou a existência das linhagens inferidas a partir da filogenia como sendo diferentes.

Diferentemente do mtDNA os marcadores microssatélites demonstraram, de acordo com a definição de Hartl & Clark (1997), uma moderada diferenciação das três linhagens nos conjuntos de dados D1 (A2, A101, A111, B1A, B106, C108 e D109) e D2 (A2, A111, B1A e D109), com um valor de F_{ST} global de 0,034 e 0,078, respectivamente. Os grupos demonstraram grande número de alelos exclusivos, com destaque para a população C com 27,1% para a abordagem D1 e 30,8% na abordagem D2, indicando restrições do fluxo gênico entre os grupos (Slatkin, 1985). Além disso, as análises do STRUCTURE e do DAPC evidenciam A e B como sendo um grupo diferente de C. A abordagem D2 apesar de possuir menos loci trouxe um resultado mais expressivo, devido talvez aos alelos nulos que foram removidos, porém presentes na abordagem D1. A AMOVA juntando A e B em um agrupamento único diferente de C com o conjunto de dados D2 retornou uma maior variação entre as populações em comparação com a AMOVA utilizando os três grupos definidos pela filogenia e pela análise de delimitação de espécies, porém o conjunto D1 demonstrou o contrário.

Os resultados da PCA dos dados de morfometria não fornecem evidências suficientes de os grupos sejam significativamente diferentes entre si, apesar de haver uma diferenciação de C em relação a A e B, que porém não ficaram bem definidas como mostra os gráficos de dispersão da análise de componentes principais.

A partir dos resultados é possível observar que existem diferentes agrupamentos genéticos nas populações de *R. quelen* do Alto Rio Iguaçu com certa limitação de fluxo gênico. Os dados de mtDNA sugerem três linhagens, enquanto os marcadores microssatélites sugerem dois ou três agrupamentos. A análise de componentes principais apresenta uma leve uma distinção populacional, sobretudo com relação a população C, da mesma forma que os microssatélites.

Essa estrutura genética observada nas linhagens do Rio Iguaçu poderia ser resultado de contato secundário de diferentes linhagens mitocondriais - observadas por Ríos (2017) - causado por sucessivos eventos de transgressão e regressão marinha ocorridos durante as glaciações do Pleistoceno (Angrizani & Malabarba, 2018). Esses eventos teriam afetado diretamente o tamanho das populações e provocado sucessivos casos de especiação alopátrica que resultaram no aumento do isolamento genético e a subdivisão entre os grupos (Albert & Reis, 1998). A hibridização dessas populações, que evoluíram em alopatria, poderia explicar o complexo *R. quelen* e sua complicada taxonomia (Ríos *et al.* 2019). Porém, não é o caso observado nas populações do Alto Rio Iguaçu coletadas em São Mateus do Sul e Lapa, como evidenciam os dados de microssatélites que suportam a existência de pelo menos dois agrupamentos genéticos na bacia. Se essa estrutura fosse resultado de contato secundário observaríamos diferenças das sequências mitocondriais, mas não nos dados de microssatélites.

Portanto, é possível que essa estrutura genética das populações do Alto Rio Iguaçu seja resultado da ocorrência de espécies que não pertençam à *R. quelen* e por esse motivo C apresente maior isolamento genético de A e B, apesar de ocorrerem em simpatria. Equivalentemente, Garavello & Shibatta (2016), utilizando dados morfométricos e cariotípicos, demonstraram a presença das espécies *R. branneri* e *R. voulezi* no Rio Iguaçu, antes consideradas como *R. quelen* na classificação de Silfvergrip (1996), o que reforça a existência do complexo de espécies na bacia.

Análises posteriores com um maior número de atributos poderão confirmar a presença de duas ou três espécies ocorrendo no Alto Rio Iguaçu e a adição de um maior número de marcadores de sequência, incluindo fragmentos nucleares, maior número amostral e maior número de loci de marcadores microssatélites analisados pode trazer melhores respostas quanto às relações dentro do complexo *Rhamdia quelen*.

REFERÊNCIAS

- Adamack, A.T. and Gruber, B. (2014). PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(4), 384-387. doi:10.1111/2041-210X.12158.
- Albert, J.S.; Reis, R.E. Introduction to Neotropical Freshwaters. In *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*; Albert, J.S., Reis, R.E., Eds.; University of California Press: Berkeley, CA, USA, 2011; pp. 3–19.
- Allendorf, F., Hohenlohe, P., & Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 11, 697–709.
- Angrizani, Rafael Costa. "Desvendando *Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824." (2018).
- Angrizani, Rafael C., and Luiz R. Malabarba. "Morphology and molecular data reveal the presence of two new species under *Rhamdia quelen* (Quoy Gaimard, 1824) (Siluriformes: Heptapteridae) species complex." *Zootaxa* 4388.1 (2018): 44-60.
- Angrizani, Rafael Costa, and Luiz Roberto Malabarba. "Genetic diversity and species delimitation in *Rhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae) in South America, with a redescription of *R. quelen* (Quoy amp; Gaimard, 1824)." *Zootaxa* 4801.1 (2020): zootaxa-4801.
- Bandelt H, Forster P, Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1):37–48.
- Benjamini, Yoav; Yekutieli, Daniel. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of statistics*, p. 1165-1188, 2001. Bookstein, F. L.; Chernoff, B.; Elder, R. L.; Humphries Jr., J. M.; Smith, G. R.; Strauss, R. E. 1985. *Morphometrics in Evolutionary Biology. The Geometry of Size and Shape Change, with Examples from Fishes* (Philadelphia: Academy of Natural Sciences), Special Publications 15, 277 p.
- Bookstein, F. L.; Chernoff, B.; Elder, R. L.; Humphries Jr., J. M.; Smith, G. R.; Strauss, R. E. 1985. *Morphometrics in Evolutionary Biology. The Geometry of Size and Shape*

Change, with Examples from Fishes (Philadelphia: Academy of Natural Sciences), Special Publications 15, 277 p.

Daniels, A. 2019. *Rhamdia quelen*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T186386A1812282. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T186386A1812282.en>.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.

Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

Evanno, Guillaume, Sebastien Regnaut, and Jérôme Goudet. "Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study." *Molecular ecology* 14.8 (2005): 2611-2620.

Excoffier, Laurent, and Heidi EL Lischer. "Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows." *Molecular ecology resources* 10.3 (2010): 564-567.

Ferreira, Daiane, et al. "Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals." *Chemosphere* 79.9 (2010): 914-921.

Fenocchio, Alberto Sergio, et al. "Short Note Karyotypic Characterization and NOR Analysis by Different Banding Techniques of *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) from the First Plateau of the Iguacu River (Brazil)." *Folia biologica* 51.3-4 (2003): 219-222.

Folmer O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299 (1994).

Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2019. FishBase.World Wide Web electronic publication.www.fishbase.org, version (12/2019)

Garavello, Julio Cesar, and Oscar Akio Shibatta. "Reappraisal of *Rhamdia branneri* Haseman, 1911 and *R. voulezi* Haseman, 1911 (Siluriformes: Heptapteridae) from the rio Iguaçu with notes on their morphometry and karyotype." *Neotropical Ichthyology* 14 (2016).

Garcia, Caroline. Estudos cromossômicos e moleculares em *Rhamdia* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae): análise de relações evolutivas. Diss. Universidade de São Paulo, 2009.

Garcia, Caroline, *et al.* "B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae)." *Cytologia* 68.4 (2003): 403-411.

Garcia, C., C. Oliveira, and L. F. Almeida-Toledo. "Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes." *Genetics and Molecular Research* (2010): 365-384.

Geerinckx, Tom, *et al.* "A systematic revision of the African catfish genus *Parauchenoglanis* (Siluriformes: Claroteidae)." *Journal of Natural History* 38.6 (2004): 775-803.

Gluszczak, Lissandra, *et al.* "Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146.4 (2007): 519-524.

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

Hartl, Daniel L., Andrew G. Clark, and Andrew G. Clark. Principles of population genetics. Vol. 116. Sunderland, MA: Sinauer associates, 1997.

Hashimoto, Diogo T., *et al.* "Molecular identification of intergenus crosses involving catfish hybrids: risks for aquaculture production." *Neotropical Ichthyology* 14.2 (2016).

Hernández, Carmen Liliana, *et al.* "Genetic and morphometric evidence for the recognition of several recently synonymized species of trans-Andean *Rhamdia* (Pisces: Siluriformes: Heptapteridae)." *Copeia* 103.3 (2015): 563-579.

Holland, Mitchell M., and Walther Parson. "GeneMarker® HID: A reliable software tool for the analysis of forensic STR data." *Journal of forensic sciences* 56.1 (2011): 29-35.

Ingenito, Leonardo FS, and Paulo A. Buckup. "The Serra da Mantiqueira, south-eastern Brazil, as a biogeographical barrier for fishes." *Journal of Biogeography* 34.7 (2007): 1173-1182.

Jombart, T (2008). "ade4: a R package for the multivariate analysis of genetic markers." *Bioinformatics*, 24, 1403-1405. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129.

Kassambara, Alboukadel and Mundt, Fabian (2020). factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>

Katoh, Kazutaka, John Rozewicki, and Kazunori D. Yamada. "MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization." *Briefings in bioinformatics* 20.4 (2019): 1160-1166.

Kreutz, Luiz Carlos, et al. "Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings." *Ciência Rural* 38 (2008): 1050-1055.

Leigh, JW, Bryant D (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116.

Loureiro, M.; Zarucki, M.; González, I.; Vidab, N.; Fabiano, G. Peces Continentales. In *Especies Prioritarias Para La Conservación En Uruguay. Vertebrados, Moluscos Continentales Y Plantas Vasculares*; Soutullo, A., Clavijo, C.M.-L.J.A., Eds.; SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/MEC: Montevideo, Uruguay, 2013; pp. 91–112. ISBN 9789974825970.

Martinez, Juliana F., *et al.* "Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins." *Caryologia* 64.1 (2011): 121-128.

Miller, R. G. (1981) *Simultaneous Statistical Inference*. Springer.

MPA [Ministério da Pesca e Aquicultura] (2013) *Boletim estatístico da pesca e aquicultura, Brasil 2011*. MPA Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília, 60 pp.

Narum, Shawn R. Beyond Bonferroni: less conservative analyses for conservation genetics. *Conservation genetics*, v. 7, n. 5, p. 783-787, 2006.

Palumbi, S. R, Martin, A. P., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L., & Grabowski, G. (1991). *The simple fools guide to PCR, version 2.0*. Privately published.

Paradis E. 2010. pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics* 26: 419-420.

Perdices, A., & Doadrio, I. (2001). The molecular systematics and biogeography of the European cobitids based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19, 468–478. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0900>

Perdices, Anabel, *et al.* "Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in central America." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25.1 (2002): 172-189.

Pritchard, Jonathan K., Matthew Stephens, and Peter Donnelly. "Inference of population structure using multilocus genotype data." *Genetics* 155.2 (2000): 945-959.

Reid, Noah M., and Bryan C. Carstens. "Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model." *BMC evolutionary biology* 12.1 (2012): 1-11.

Ríos, Néstor, et al. "Species complex delimitation and patterns of population structure at different geographic scales in Neotropical silver catfish (*Rhamdia*: Heptapteridae)." *Environmental Biology of Fishes* 100.9 (2017): 1047-1067.

Ríos, Néstor, Carmen Bouza, and Graciela García. "Past hybridisation and introgression erased traces of mitochondrial lineages evolution in the Neotropical silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae)." *Hydrobiologia* 830.1 (2019): 161-177.

R Core Team (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RStudio Team (2021). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Scaranto, B.M.S.; Ribolli, J.; Zaniboni-Filho, E. DNA barcoding reveals blend of silver catfish *Rhamdia* species from fish farms in Southern Brazil. *Aquac. Res.* 2018, 49, 1907–1913.

Sebastien Le, Julie Josse, Francois Husson (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1-18. 10.18637/jss.v025.i01

Seutin, Gilles, Bradley N. White, and Peter T. Boag. "Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses." *Canadian journal of zoology* 69.1 (1991): 82-90.

Schwarz, Gideon. "Estimating the dimension of a model." *The annals of statistics* (1978): 461-464.

Silfvergrip, A. M. C. (1996). A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Stockholm: Museum of Natural History, Stockholm University. 156p.

Silva, Jislaine Cristina da, Rosilene Luciana Delariva, and Karine Orlandi Bonato. "Food-resource partitioning among fish species from a first-order stream in northwestern Paraná, Brazil." *Neotropical Ichthyology* 10.2 (2012): 389-399.

Slatkin, Montgomery. "Rare alleles as indicators of gene flow." *Evolution* 39.1 (1985): 53-65.

Suchard, Marc A., et al. "Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10." *Virus evolution* 4.1 (2018).

Valladão, Gustavo Moraes Ramos, Sílvia Umeda Gallani, and Fabiana Pilarski. "South American fish for continental aquaculture." *Reviews in Aquaculture* 10.2 (2018): 351-369.

Vitule, Jean Ricardo Simões, Carolina Arruda Freire, and Daniel Simberloff. "Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad." *Fish and Fisheries* 10.1 (2009): 98-108.

**ANEXO I – CONTRIBUIÇÕES DAS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS DE *R. quelen*
PARA A ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)**

	Componente 1	Componente 2	Componente 3
SL	3,000%	0,032%	0,157%
IPcD	2,958%	0,499%	0,022%
IPvD	2,856%	0,002%	1,788%
MxBH	2,841%	1,869%	0,241%
PDL	2,973%	0,354%	0,073%
IDCbD	2,958%	0,003%	0,822%
IDAdD	1,774%	5,608%	67,055%
PPcL	2,957%	0,143%	0,420%
PPvL	2,985%	0,001%	0,014%
PAnL	2,986%	0,088%	0,309%
IPvAD	2,745%	1,686%	3,657%
AdCID	2,875%	0,199%	0,062%
MnCPH	2,910%	0,071%	0,235%
PvFL	2,670%	1,283%	4,041%
AFbL	2,637%	0,422%	0,725%
AFL	2,554%	0,053%	1,065%
DFBL	2,844%	0,127%	0,886%
DFL	2,620%	2,493%	0,583%
DSL	2,751%	3,782%	1,195%
PcSL	2,909%	0,743%	0,058%
AdFL	2,927%	0,005%	0,081%
HL	2,990%	0,082%	0,059%
PrOL	2,987%	0,150%	0,010%
OHH	2,946%	0,011%	0,055%
HH	2,896%	1,071%	0,032%
OD	2,701%	4,075%	1,306%
IOD	2,974%	0,042%	0,114%
MW	2,943%	0,038%	0,727%
PmxTW	2,700%	0,025%	0,271%
PmxTL	2,828%	0,583%	2,026%
MTW	1,188%	68,393%	7,830%
MTL	2,539%	4,286%	0,477%
MxBID	2,917%	0,024%	0,337%
ANID	2,889%	0,759%	3,003%
APNI	2,880%	0,795%	0,220%
PNOD	2,893%	0,204%	0,045%