



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação

**FILOGEOGRAFIA DA ESPÉCIE DE PEIXE MINIATURA
Fluviphylax simplex (CYPRINODONTIFORMES:
FLUVIPHYLACIDAE) AO LONGO DA REGIÃO
HIDROGEOGRÁFICA AMAZÔNICA**

DHÁLLYTH ZAÍNNY PEREIRA SILVA

São Luís/MA

2024

DHÁLLYTH ZAÍNNY PEREIRA SILVA

FILOGEOGRAFIA DA ESPÉCIE DE PEIXE MINIATURA
Fluviphylax simplex (CYPRINODONTIFORMES:
FLUVIPHYLACIDAE) AO LONGO DA REGIÃO
HIDROGEOGRÁFICA AMAZÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientador (a): Prof. Dr. Pedro Henrique Negreiros de Bragança.

Co-orientador (a): Prof. Dr. Felipe Polivanov Ottoni.

São Luís/MA

2024

Dhállyth Zainny Pereira Silva

Filogeografia da espécie de peixe miniatura *Fluviphylax simplex*
(Cyprinodontiformes: Fluviphylacidae) ao longo da Região Hidrográfica
Amazônica / Dhállyth Zainny Pereira Silva – São Luís: MA, 2024.

54 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Negreiros de Bragança.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa
de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, 2024.

“A glória de Deus é ocultar certas
coisas; tentar descobri-las é a
glória dos reis”

Provérbios 25:2

A Deus, com amor e devoção.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter me dado a oportunidade de desenvolver e realizar mais um dos meus grandes sonhos. Agradeço pelo Seu amor e Sua misericórdia, que eu tenho visto se renovar em todas as manhãs. Eu O adoro, e todo o meu esforço e gratidão ainda são pequenos frente à Sua imensidão. A Ele toda honra, glória e louvor nos céus e na terra.

Agradeço ao suporte fornecido pela minha grande inspiração, minha mãe Jucineide Freitas. Obrigada pela paciência, cuidado e apoio desde o início dessa jornada. Obrigada por me conduzir pelo caminho certo e por direcionar tão bem a nossa família. Meu eterno agradecimento também aos meus avós, Raimunda Nascimento e José da Cruz. Grata a Deus pela vida de vocês, por todo apoio, suporte e oração. Aos meus irmãos, Erisson Brenno, Thállyta Wendy, Larissa Horranny e Enzo Henrico, ao meu padrasto Paulo Silva e minha sobrinha Léia Organa, por me fazerem querer ser melhor, paciente e cuidadosa com a vida do próximo.

Meu eterno obrigada à minha mamãe científica, prof. Dra. Cleonilde Queiroz. Agradeço de todo o meu coração por sua condução em todos os anos de graduação, e agora por me permitir realizar os trabalhos e reuniões no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM), da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL), que eu considero a minha casa. Fico honrada por ter a oportunidade de ter as suas marcas na minha história, e a senhora sabe que é a minha meta de profissional. Sou fã da sua história, da sua forma de ensinar e, como eu já lhe disse, quero ser sua extensão no ambiente acadêmico. Obrigada sempre.

Meu agradecimento todo especial ao meu orientador prof. Dr. Pedro Bragança. Eu sabia que queria trabalhar com você desde a primeira reunião e isso só foi se confirmando com o passar dos anos. Preciso mencionar todas as suas preocupações com o andamento do trabalho que me deixavam agoniada (risos científicos), mas hoje eu entendo tudo isso. Obrigada pela paciência, o cuidado com o nosso trabalho e por ter confiado em mim na execução de um projeto que eu vejo que te importa muito. Você me ensinou, até em silêncio e distância, a ser comprometida com a ciência, com a minha pesquisa e saber zelar pelo trabalho que foi confiado a mim. Muito obrigada.

Agradeço ao meu coorientador, prof. Dr. Felipe Ottoni. Você foi fundamental financiando o ponto alto do nossa pesquisa, mas muito mais que isso, foi indispensável na condução e organização dos trabalhos. Obrigada pelo compromisso, apoio e dedicação conosco.

Obrigada a todos os meus professores e os demais servidores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, em nome dos queridos Eduardo Bezerra e Jorge Nunes. Agradeço pelas aulas, reuniões e suporte para me tornar mestre pela Universidade Federal do Maranhão.

Meu muito obrigada ao Dr. Axel Katz do Laboratório de Sistemática e Evolução de Peixes Teleósteos, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LASEPT-UFRJ), ao Dr. George Mattox do Laboratório de Ictiologia de Sorocaba, da Universidade Federal de São Carlos (LISO-UFSCar), ao Dr. Claudio Oliveira do Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista (IB-UNESP), à Dra. Camila Ribas da Coleção de Recursos Genéticos, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CRG-INPA) e ao Dr. Felipe Ottoni da Coleção Ictiológica do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, da Universidade Federal do Maranhão (CICCAA-UFMA), por me proporcionarem seu tempo e amostras de *Fluviphylax simplex* disponíveis em suas coleções.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	CAPÍTULO I	10
1	APRESENTAÇÃO GERAL	15
2	INTRODUÇÃO	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo Geral.....	25
4.2	Objetivos Específicos.....	25
	REFERÊNCIAS	26
	CAPÍTULO II	30
	INTRODUÇÃO	30
	MATERIAL E MÉTODOS	33
	Obtenção das amostras.....	33
	Extração de DNA, PCR e sequenciamento.....	34
	Análise genética.....	34
	RESULTADOS	35
	Caracterização da diversidade genética à nível intrapopulacional.....	35
	Relações entre populações.....	37
	História demográfica.....	41
	Estrutura populacional.....	42
	Descrição do padrão de colorido em vida de <i>Fluviphylax simplex</i>	43
	DISCUSSÃO	45
	REFERÊNCIAS	50
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAm	DNA mitocondrial
CP	Comprimento padrão
Pb	Pares de base
<i>F.</i>	<i>Fluviphylax</i>
COI	Citocromo c oxidase I
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
BI	Inferência Bayesiana
AMOVA	Análise da Variância Molecular
H	Haplótipo

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Amostragem de <i>Fluviphylax simplex</i> considerando cada localidade. SO = rio Solimões (Alvarães, Tefé e Marañ); PU = rio Purus (Beruri); NE = rio Negro (Santa Isabel do Rio Negro e Manaus); TA = rio Tapajós (Santarém); UA = rio Uaicurapá (Parintins).....	37
Tabela 2 – Composição nucleotídica de cada população ao longo da distribuição de <i>Fluviphylax simplex</i> . P= população; N (%) = valor relativo da composição nucleotídica. A= adenina; T= timina; G= guanina; C= citosina; UP= rio Uaicurapá, Parintins; TS= rio Tapajós, Santarém; NM= rio Negro, Manaus; NS= rio Negro, Santa Isabel do Rio Negro; SM= rio Solimões, Marañ; SA= rio Solimões, Alvarães; ST= rio Solimões, Tefé; PB= rio Purus, Beruri.....	37
Tabela 3 – Comparação par a par dos valores dos índices de fixação das populações de <i>F.simplex</i> . Os valores em negrito apresentam significância (P<0.05). UP= rio Uaicurapá, Parintins; TS= rio Tapajós, Santarém; NM= rio Negro, Manaus; NS= rio Negro, Santa Isabel do Rio Negro; SM= rio Solimões, Marañ; SA= rio Solimões, Alvarães; ST= rio Solimões, Tefé; PB= rio Purus, Beruri.....	43
Tabela 4 – Resultados da análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) das sequências da região Citocromo c oxidase I de oito populações de <i>Fluviphylax simplex</i> . Os valores em negrito apresentam significância (P<0,05).....	44

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** – Relação filogenética de *Fluviphylax* baseada em dados morfológicos. Fonte: Costa (1996) e Costa e Le Bail (1999).....21
- Figura 2** – Relação filogenética da subordem Cyprinodontoidei, mostrando o relacionamento de *Fluviphylax* com base em genes nucleares (GLYT1, ENC1, RAG1, MYH6 e SREB2) e mitocondrial (CO1). **Fonte:** Bragança e Costa (2018).....22
- Figura 3** – Espécime de *F. simplex* da localidade tipo em Parintins (Amazonas). Fonte: Bragança, P.H.N. (2012).....23

CAPÍTULO II

- Figura 1** – Pontos de coleta de *Fluviphylax simplex* obtidos de coleções ictiológicas do Brasil. As cores representam os municípios onde os indivíduos foram coletados: azul indica Santa Isabel do Rio Negro, marrom indica Marañ, nude indica Tefé, verde claro indica Alvarães, amarelo indica Beruri, roxo indica Manaus, violeta indica Borba, verde escuro indica Parintins e rosa indica Santarém.....34
- Figura 2** – Árvore filogenética obtida pela análise de Inferência Bayesiana (BI) baseada na região Citocromo c oxidase I do DNA mitocondrial de *Fluviphylax simplex*. Os valores acima da barra são valores de probabilidade superior a 50%, a partir da análise de verossimilhança.....39
- Figura 3** – Rede de haplótipos de *Fluviphylax simplex* com o *dataset* completo (600 pares de bases). Os círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos e as cores dentro dos círculos correspondem às localidades. Os traços representam os passos mutacionais entre os haplótipos. Círculos pretos são pontos intermediários não encontrados (*missing haplotypes*).....40
- Figura 4** – Rede de haplótipos de *Fluviphylax simplex* após o *trimming* das sequências (502 pares de bases). Os círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos e as cores dentro dos círculos correspondem às localidades. Os traços representam os passos mutacionais entre os haplótipos. Círculos pretos são pontos intermediários não encontrados (*missing haplotype*).....41
- Figura 5** – Distribuição das frequências de diferenças pareadas na região COI do mtDNA das sequências com 600 pb de *Fluviphylax simplex* analisadas. A linha em verde representa a frequência esperada das diferenças pareadas entre os haplótipos estudados no modelo de expansão demográfica, enquanto a linha vermelha sinaliza a frequência observada. O eixo X representa o número de diferenças entre os haplótipos, enquanto o eixo Y representa a frequência de cada número de diferenças.....42
- Figura 6** – Padrão do colorido em via de machos da espécie *Fluviphylax simplex* ao longo de sua ampla distribuição, nas localidades de (A) Alter do Chão, Tapajós, (B) Ariau, baixo rio Negro, (C) Beruri, rio Purus, (D) Solimões, Manacapuru, (E) Tibarrá, Santa Isabel do Rio Negro, alto rio Negro, (F) Parintins.....45

RESUMO

Introdução. O gênero *Fluviphylax* compreende espécies de peixes ovíparos que estão entre os menores indivíduos da região Amazônica, com comprimento padrão inferior aos 22 mm. Um fenótipo miniaturizado, como o identificado em *Fluviphylax*, corresponde a redução extrema do tamanho corporal do indivíduo adulto. Essa redução possui influência da combinação de características plesiomórficas e apomórficas importantes na história evolutiva do grupo, como o aumento da variabilidade morfológica, o surgimento de novidades morfológicas ou redução e simplificação estrutural. Pressões bióticas na exploração de recursos alimentares e fuga de predação é uma válida hipótese para a miniaturização da ictiofauna dulcícola na Amazônia.

Objetivo. O objetivo deste trabalho é determinar a área de distribuição de *Fluviphylax simplex*, por meio da identificação de espécimes em coleções ictiológicas e do sequenciamento de um marcador de evolução rápida, o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI).

Metodologia. através do sequenciamento de um fragmento (600 bp) do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de 21 indivíduos da espécie ao longo da sua distribuição. Foram analisados dois *datasets* (600 pb e 502 pb) que resultaram em duas redes de haplótipos. Além disso, uma relação filogenética entre os haplótipos foi inferida por meio da Inferência Bayesiana.

Resultados. A elevada diversidade haplotípica ($Hd = 0,9381$) observada globalmente em *Fluviphylax simplex* indica alta variabilidade genética demonstrando maior proporção de haplótipos dentro das populações. Já a diversidade nucleotídica baixa ($\pi = 0,0150$) é consistente com a origem relativamente recente da espécie no final do Mioceno, há aproximadamente 6,5 milhões de anos. Pela primeira vez foi identificada a presença da espécie no médio rio Negro próximo à Santa Isabel do Rio Negro, indicando a provável existência de uma conexão entre as cabeceiras de tributários do rio Solimões e do rio Negro. A conexão observada entre as populações de *F. simplex* revela que grande parte dessa comunicação pode estar associada às várzeas, uma das principais forças que direciona a diversidade da ictiofauna no ambiente associada a fatores de sazonalidade, além das cabeceiras de pequenos córregos no interior das florestas. Foi realizada uma descrição do colorido em vida da espécie baseando-se em diferentes indivíduos distribuídos ao longo de sua ampla distribuição.

Palavra-chave: *Fluviphyla*; Bacia Amazônica; COI; colorido em vida

ABSTRACT

Introduction. The genus *Fluviphylax* comprises species of oviparous fish that are among the smallest individuals in the Amazon region, with a standard length of less than 22 mm. A miniaturized phenotype, as identified in *Fluviphylax*, corresponds to an extreme reduction in the body size of the adult individual. This reduction is influenced by the combination of plesiomorphic and apomorphic characteristics important in the evolutionary history of the group, such as increased morphological variability, the emergence of morphological novelties or structural reduction and simplification. Biotic pressures on the exploitation of food resources and escape from predation is a valid hypothesis for the miniaturization of freshwater ichthyofauna in the Amazon. **Objective.** The objective of this study is to determine the distribution area of *Fluviphylax simplex*, through the identification of specimens in ichthyological collections and the sequencing of a rapidly evolving marker, the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COI) gene. **Methodology.** through the sequencing of a fragment (600 bp) of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COI) gene from 21 individuals of the species throughout its distribution. Two datasets (600 bp and 502 bp) were analyzed, resulting in two haplotype networks. In addition, a phylogenetic relationship between the haplotypes was inferred through Bayesian Inference. **Results.** The high haplotype diversity ($Hd = 0.9381$) observed globally in *Fluviphylax simplex* indicates high genetic variability demonstrating a higher proportion of haplotypes within populations. On the other hand, the low nucleotide diversity ($\pi = 0.0150$) is consistent with the relatively recent origin of the species in the late Miocene, approximately 6.5 million years ago. For the first time, the presence of the species was identified in the middle Rio Negro near Santa Isabel do Rio Negro, indicating the probable existence of a connection between the headwaters of the tributaries of the Solimões and Rio Negro rivers. The connection observed between the populations of *F. simplex* reveals that much of this communication may be associated with the floodplains, one of the main forces that direct the diversity of the ichthyofauna in the environment associated with seasonal factors, in addition to the headwaters of small streams within the forests. A description of the species' coloration in life was made based on the life of different individuals of the species distributed throughout its wide distribution.

Key-words: *Fluviphylax*; Amazon Basin; COI; coloration in life

1. APRESENTAÇÃO GERAL

O presente trabalho intitulado “Filogeografia da espécie de peixe miniatura *Fluviphylax simplex* (Cyprinodontiformes: Fluviphylacidae) ao longo da Região Hidrogeográfica Amazônica” apresenta uma nova abordagem acerca de uma espécie endêmica da Amazônia, cuja dinâmica ecológica e de distribuição ainda não estão bem definidas. Para contribuir com a escassa literatura acerca das espécies miniaturas em território nacional, esse estudo é apresentado em dois capítulos.

O Capítulo I contém uma revisão de literatura que aborda a diversidade de peixes de água doce, bem como na Bacia Amazônica, a classificação dos rios amazônicos, distribuição e caracterização morfológica e filogenética do gênero *Fluviphylax* Whitley 1965, com destaque para a espécie focal do estudo, *Fluviphylax simplex* Costa, 1996, além do uso de marcadores moleculares em estudos filogenéticos e de microevolução.

O Capítulo II corresponde ao artigo I, que leva o mesmo título do trabalho. Nele são apresentadas a caracterização genética e as relações entre as espécies de *Fluviphylax simplex*, sua amplitude de distribuição, um novo registro da espécie no médio rio Negro, discussão acerca da possível manutenção de conectividade entre as populações e a descrição do padrão de colorido em vida da espécie.

A dissertação foi elaborada de acordo com as diretrizes do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBC), pelas regras da ABNT. Para o Capítulo correspondente ao artigo I, considerou-se as normas da revista *Neotropical Ichthyology*.

2. INTRODUÇÃO

Localizada na América do Sul, a região biogeográfica Neotropical apresenta elevado nível de diversidade biológica. Fatores históricos e ecológicos estão diretamente associados ao caráter megadiverso da região, em especial no que diz respeito às mudanças ambientais e climáticas, ou mesmo barreiras geográficas que naturalmente se estabelecem e levam a eventos de especiação no decurso temporal (Menin, 2016; Ottoni *et al.*, 2023). Uma de suas bacias, a Amazônica, chega a ocupar até 7 milhões de km² englobando países como Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela (Menin, 2016). Como destacam Antonelli *et al.* (2018), a Amazônia é a região que mais tem contribuído para a biodiversidade dos trópicos americanos, certamente pela manutenção das linhagens amazônicas que tanto se dispersaram pelo continente.

Em território nacional, a Bacia Amazônica constitui o que Ross e Prete (1988 apud Santos, 2014) destaca como uma unidade hidrogeomorfológica, cuja composição fluvial é basilar na definição de geossistema. A região hidrográfica Amazônica abrange os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Tocantins, Pará, Rondônia e Roraima, e apresenta o rio Amazonas como seu principal formador (Cardozo *et al.*, 2023). Para Sioli (1950), a composição dessa bacia está confinada a três tipos de rios: de águas barrentas/brancas, de águas claras e de águas pretas, cada um com características químicas distintas.

Os rios de água branca são caracterizados pela elevada concentração de nutrientes resultantes da produtividade biológica elevada, e pela aparência lamacenta. São rios que nascem na Cordilheira dos Andes, uma unidade morfoestrutural de formação orogênica recente, que carrega muitos sedimentos em suspensão. Já os rios de águas claras e pretas apresentam semelhante estrutura geológica, pois nascem de antigos escudos do Brasil e Guianas. Suas águas apresentam transparência e menores concentrações de nutrientes, pois drenam áreas com rochas mais antigas (Montanher, 2013; Borghezani *et al.*, 2021). As águas pretas, por sua vez, são ricas em ácidos húmicos em decorrência das substâncias orgânicas dissolvidas a partir da decomposição da vegetação em igarapés e pequenos rios dentro das florestas.

As alterações geoquímicas nas águas da Bacia Amazônica refletem sua grande diversidade biológica (Santos, 2014). Da fauna aquática até então descrita, o ambiente dulcícola neotropical abrange mais de 6000 espécies de vertebrados (Albert *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2024), sendo que grande parcela dos indivíduos é endêmica da Amazônia (Reis *et al.*, 2016). O

elevado endemismo, bem como a diversidade e a riqueza das comunidades de peixes estão associadas a aspectos do próprio ambiente. Leal *et al.* (2018) destacam três aspectos primordiais para esse cenário: alterações nos níveis das águas, biótopos e habitats complexos, e as diferentes características geoquímicas.

Os estudos filogeográficos baseados em análises de dados contidos no sequenciamento de DNA, por meio do uso de marcadores moleculares, puderam promover a reconstrução da história evolutiva dos grupos da ictiofauna no cenário brasileiro. Tal importância não fica restrita à filogenia ou estudos de sistemática, mas são indispensáveis na compreensão dos fatores ambientais envolvidos na estruturação das comunidades bióticas (Buckup, 2021). Grupos monofiléticos, como é o caso de todas as espécies do gênero *Fluviphylax* Whitley 1965, dado fortemente suportado por Bragança e Costa (2018), são capazes de identificar a história evolutiva dos próprios sítios de distribuição, uma vez que a biota e o mundo evoluem em harmonia. Além disso, distinções na ecologia e geologia de ambientes podem ser cruciais para impulsionar processos de especiação, já que estão submetidos a diferentes pressões de seleção (Souza, 2011).

O gênero *Fluviphylax* compreende espécies de peixes ovíparos que estão entre os menores indivíduos da região Amazônica, com comprimento padrão inferior aos 22 mm (Costa, 1996). Um fenótipo miniaturizado, como o identificado em *Fluviphylax*, corresponde a redução extrema do tamanho corporal do indivíduo adulto. Essa redução possui influência da combinação de características plesiomórficas e apomórficas importantes na história evolutiva do grupo, como o aumento da variabilidade morfológica, o surgimento de novidades morfológicas ou redução e simplificação estrutural (Hanken e Wake, 1993). Pressões bióticas na exploração de recursos alimentares e fuga de predação é uma válida hipótese para a miniaturização da ictiofauna dulcícola na Amazônia (Roberts, 1972).

O gênero *Fluviphylax* possui oito espécies: *F. pygmaeus*, *F. simplex* Costa, 1996, *F. obscurus* Costa, 1996, *F. zonatus* Costa, 1996, *F. palikur* Costa & Le Bail, 1999, *F. wallacei* Bragança, 2018, *F. gouldingi* Bragança, 2018 e *F. rubens* Huber 2024. Dentre as características descritas para essas espécies são destaque o espaço pré-orbital reduzido e olhos aumentados. A distribuição do gênero estende-se principalmente por duas grandes bacias sul-americanas, o Orinoco e o Amazonas cuja conexão é estabelecida pelo Canal Cassiquiare, além de ocorrer em bacias costeiras no estado do Amapá (Souza, 2008). Costa (1996) delimita a distribuição do gênero em território brasileiro, indicando a presença de espécies pela bacia central da

Amazônia, que inclui as águas dos rios Solimões, Negro, Amazonas, Madeira, Tapajós e Trombetas.

A recente remoção de *Fluviiphylax* da família Poeciliidae e inclusão em Fluviiphylacidae (Bragança *et al.*, 2018) revela a escassez e, ao mesmo tempo, a necessidade de estudos acerca da história de espécies de peixe miniatura. Essa premissa é válida para toda a ictiofauna pouco conhecida e altamente ameaçada que habita as águas da região amazônica (Buckup, 2021; Pelicice *et al.*, 2021). Na família Fluviiphylacidae, a espécie *Fluviiphylax simplex* Costa 1996 apresenta grande amplitude de distribuição e se torna uma importante candidata para informar sobre a história evolutiva do grupo, do ambiente e preencher lacunas quanto ao fluxo gênico e conectividade de suas populações muitas vezes separadas por águas de condições geoquímicas diferentes (brancas, claras e pretas).

Dentro desse contexto, este trabalho buscou contribuir para a compreensão de como uma espécie miniatura especializada em ambientes lênticos e de águas com poucos sedimentos consegue manter fluxo genético ao longo de toda a sua distribuição, incluindo entre as margens norte e sul do Amazonas/Solimões, conhecido pela alta concentração de sedimentos. O intuito é identificar as possíveis rotas de conexão entre as diferentes populações e fornecer subsídios para descrever os padrões encontrados como modelos e referências para estudos semelhantes com peixes de pequeno porte, muitos deles com grande potencial para a aquariofilia e de grande importância ecológica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A maior diversidade de peixes de água doce do mundo está concentrada na América do Sul. Dentre os vertebrados, eles correspondem a mais de 15% das espécies, cujas origens datam do período Cretáceo (Bloom e Lovejoy, 2017; Val *et al.*, 2022; Ottoni *et al.*, 2023). Grande parte de sua distribuição está associada à dinâmica da paisagem frente a eventos paleogeográficos e ambientais (Bragança e Costa, 2018; Cassemiro *et al.*, 2023). Das três bacias dulcícolas que dominam a América do Sul, Bacia Amazônica, Bacia do Paraná-Paraguai e Bacia de São Francisco, a Amazônica é a que apresenta a maior diversidade da ictiofauna, pois das 2411 espécies que ali ocorrem, cerca de 50% são endêmicas (Reis *et al.*, 2016). Seu principal rio, o rio Amazonas, consta com bacias hidrográficas associadas que servem de abrigo para mais das 6000 espécies descritas para a região Neotropical (Amorim e Costa, 2022; Fricke *et al.*, 2023).

Em território brasileiro, a Bacia Amazônica possui várzeas diretamente associadas aos pulsos de inundação que provocam variações nos níveis das águas. Tais áreas podem servir a muitos peixes para a busca de recursos alimentares ou fuga de predadores (Leal *et al.*, 2018). O padrão de distribuição atual e a diversidade de peixes na região, como assinalado por Bragança e Costa (2018), também podem estar associados a eventos biogeográficos, a exemplo da elevação andina e episódios de introgressão marinha ocorridos no Mioceno. Conforme Borghezan *et al.* (2021), é possível estabelecer relação entre a diversidade de peixe de água doce encontrada na Amazônia aos diferentes tipos de águas que a compõe, cada um desses tipos apresentando características distintas. Neese sentido, os rios amazônicos podem apresentar três tipos de águas: brancas, claras e pretas (Filizola e Guyot, 2011).

Os rios Madeira, Purus, Solimões e Amazonas figuram exemplos de rios com águas barrentas, cuja origem é observada em áreas elevadas a partir do intemperismo dos Andes, um dobramento moderno de intensa atividade sedimentar e tectônica. Áreas com essas características estão, inclusive, atreladas à indução de ocorrência de endemismo em táxons adaptados a elevadas altitudes e de modificações na paisagem (Silva *et al.*, 2011). Os rios de águas claras, como Tapajós e Xingu, possuem nascentes provenientes dos escudos Brasileiro e das Guianas, de composição rochosa mais antiga que datam do período Paleozoico e Pré-Cambriano (Menin, 2016). Os rios de águas pretas, como o rio Negro e Tefé, possuem semelhante relação geológica de rochas pré-cambrianas, porém não apresentam os solos e

cabeceiras do relevo tão movimentados, o que influencia diretamente na diminuição de partículas suspensas a serem transportadas (Silva *et al.*, 2013).

Lowe-McConnell (1987) apresentou que a diversidade de peixes existentes na bacia Amazônica está principalmente em duas ordens, Characiformes e Siluriformes, correspondendo a 43% e 39% da diversidade total de peixes, respectivamente, enquanto que Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e demais ordens compõem os 18% restantes. Dentre os Cyprinodontiformes conhecidos existem espécies miniaturas, que por vezes passam despercebidas pela associação de sua morfologia miniatura com o aspecto juvenil de outros peixes que, certamente, ultrapassam os 26 mm de CP (Costa e Le Bail, 1999). Essa ordem, também reconhecida como o grupo das carpas com dentes, é formada por mais de 1000 espécies atuais alocadas em 125 gêneros e dez famílias, de subordens Cyprinodontoidei e Aplocheiloidei (Costa, 2012; Pohl *et al.*, 2015). À exceção da Antártica e Oceania, seus representantes vivem nas águas doce e estuarina de todo o planeta (Bragança *et al.*, 2018).

Análises filogenéticas envolvendo os Cyprinodontiformes têm sido bastante utilizadas como meio informativo nos estudos de evolução e de origem biogeográfica (Pohl *et al.*, 2015; Bragança e Costa, 2019). Os esforços, no entanto, ainda são depauperados em relação à grande parte das linhagens, especialmente quando comparadas à vasta diversidade dentro da ordem (Amorim e Costa, 2022). A classificação atual para os ciprinodontoides, como demonstra Bragança e Costa (2018) aloca o gênero *Fluviphylax* como membro único de Fluviphylacidae Roberts 1970. O gênero é considerado grupo-irmão do clado formado por Poeciliidae e Anablepidae, ambos do Novo Mundo. Tal assertiva ganhou corpo nos dados de Bragança e Costa (2018), cuja relação havia sido relatada anteriormente por Helmstetter *et al.* (2016), porém com baixos índices de suporte. Desse modo, o estudo mais recente demonstrou que a divergência do ancestral da linhagem ocorreu há cerca de 37 milhões de anos durante o Eoceno. Recentemente, Morales *et al.* (2024) apresentaram outra hipótese de relacionamento, em que *Fluviphylax* é irmão do gênero *Orestias* Valenciennes 1839, este último compreendendo apenas espécies ovíparas dos Andes.

O clado é recuperado como grupo-irmão de dois outros cladogramas, um agrupando as famílias Poeciliidae e Anablepidae, e o outro incluindo as famílias do Velho Mundo, Aphaniidae, Procatopodidae e Valenciidae. A relação filogenética molecular de *Fluviphylax* conhecidanão difere consideravelmente da proposta baseada em morfologia defendida por Costa (1996) e Costa & Le Bail (1999) (Figura 1), a não ser pela não inclusão de duas espécies

descritas posteriormente por Bragança (2018), *F. wallacei* e *F. goudingi*, apresentadas nos estudos de Bragança e Costa (2018) como *Fluviphylax* sp. A e *Fluviphylax* sp. B, respectivamente (Figura 2).

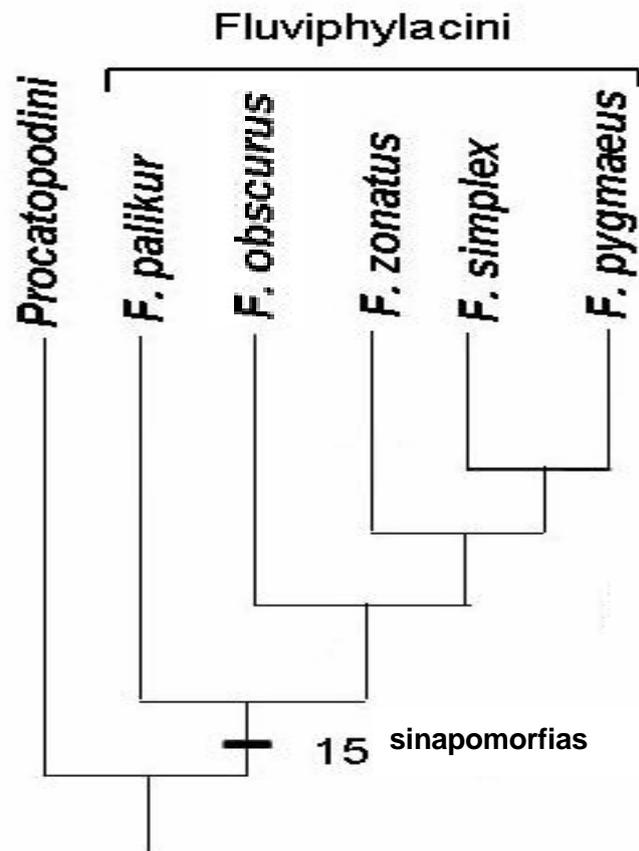


Figura 1. Relação filogenética de *Fluviphylax* baseada em dados morfológicos. **Fonte:** Costa (1996) e Costa e Le Bail (1999).

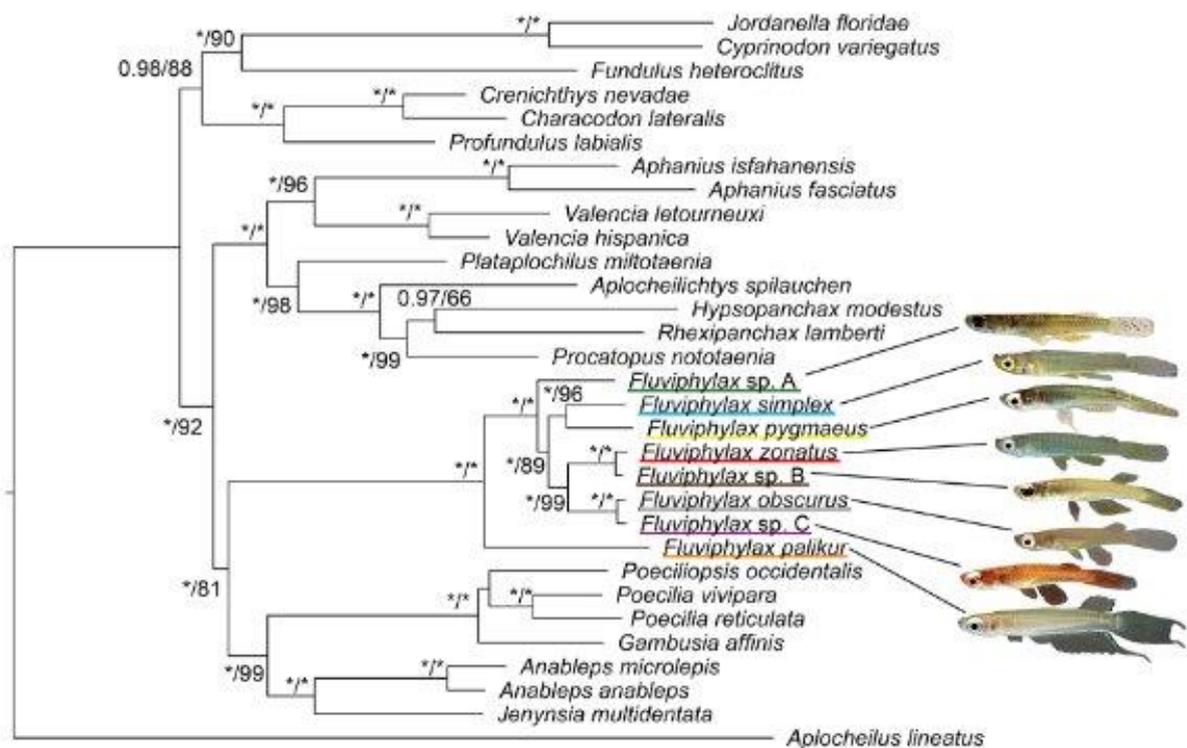


Figura 2. Relação filogenética da subordem Cyprinodontiformes, mostrando o relacionamento de *Fluviphylax* com base em genes nucleares (GLYT1, ENC1, RAG1, MYH6 e SREB2) e mitocondrial (CO1). **Fonte:** Bragança e Costa (2018).

Primeiramente, é válido destacar a relação da espécie *F. palikur* como irmã do clado contendo as demais do gênero. Em segunda instância, a relação de espécie-irmã entre *F. simplex* e *F. pygmaeus*, com divergência estimada em 6,5 milhões de anos atrás entre o Mioceno Superior e o Plioceno. A ausência da cartilagem rostral e a redução do processo ventral do osso pós-temporal são exemplos de semelhança entre ambas espécies (Bragança e Costa, 2018; Amorim e Costa, 2018). De acordo com os poucos estudos ecológicos com *Fluviphylax*, as espécies do gênero apresentam um hábito alimentar denominado neustofagia, isto é, são capazes de se alimentar de pequenos artrópodes no limite água-ar (Leitão *et al.*, 2016). O papel envolvido nesse tipo de alimentação, baseada em pequenos artrópodes terrestres que caem das copas das árvores, em sistemas com baixo aporte de nutrientes provavelmente contribui para a transferência de biomassa na rede trófica.

Avaliando os critérios de pequenas populações, áreas geográficas restritas ou estreitas tolerâncias de habitat, Leitão *et al.* (2016) classificam *Fluviphylax simplex* como estando entre

as 5% das espécies mais raras de peixe. Nas comunidades, suas atividades ecológicas refinadas estão associadas ao seu aspecto morfológico e, uma vez impactadas, são provavelmente capazes de desencadear desequilíbrios de originalidade, especialização e riqueza funcional em proporção mais ampla do que seria esperado para um cenário de redução dos papéis ecológicos realizados por espécies comuns.

A espécie *F. simplex* (Figura 3), cuja localidade tipo está em Parintins (Amazonas), é a mais bem distribuída de todo o gênero, sendo encontrada ao longo da calha amazônica, tanto na margem norte quanto na margem sul, desde a região próxima à foz do rio Tapajós até a região de Tefé (rio Solimões) (Costa, 1996). Porém, estimativas mais claras sobre a distribuição potencial da espécie ainda não foram feitas e a amplitude de sua distribuição atual permanece com lacunas de conhecimento. Dada a ampla distribuição geográfica e importância no cenário conservacionista, *F. simplex* é um excelente candidato para estudos filogeográficos, de modo a sugerir tanto os padrões quanto os processos que foram/são responsáveis pela sua dinâmica atual.



Figura 3. Espécime de *F. simplex* da localidade tipo em Parintins (Amazonas). **Fonte:** Bragança, P.H.N. (2012).

Sob o ponto de vista de Turchetto-Zolet *et al.* (2013), a definição adequada para a Filogeografia é aquela capaz, não apenas de identificar a estruturas geográficas atualmente apresentadas pelas populações, mas a que torna possível associar esse padrão de distribuição com o aspecto evolutivo influenciado por fatores históricos. Ainda, a abordagem filogeográfica detém de métodos estatísticos baseados na teoria da coalescência e os que testam a diferenciação entre as populações (Ribas e D’Horta, 2016). Como bem pontuado por Avise (2009), a filogeografia lida com as dimensões da microevolução temporal e espacialmente, a

partir da investigação de genealogias. Para tanto, faz-se necessário o uso de marcadores genéticos, também conhecidos por marcadores moleculares.

Por mais que o uso de marcadores moleculares seja criticado por alguns autores (Ebach e Holdrege, 2005; Page e Hughes, 2010), sua contribuição é inegável para análises e inferências filogenéticas e microevolutivas (Avice, 2000; Satoh *et al.*, 2016). Dentre os marcadores mais utilizados estão os pertencentes ao DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA é haploide, possui herança uniparental (materna) e ausência de recombinação gênica, fator que determina menos diferenciação intraespecífica (Tresbach *et al.*, 2015). A rigor, sua forma circular compacta de fita dupla não possui macromutações, com taxa evolutiva 10 vezes maior, em comparação a de genes nucleares, capaz de proporcionar a geração de marcadores específicos para uma espécie.

O mtDNA pode ser amplificado e sequenciado pelo uso de uma região codificadora do gene Citocromo C oxidase I, ou simplesmente COI. Esse gene apresenta, aproximadamente 600 pares de bases (pb) e codifica parte de uma enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons da respiração celular (Azevedo *et al.*, 2015). Enquanto indicador universal, é vantajoso por estar em um ambiente oxidativo, com taxa de mutação adequada para distinguir espécies proximamente relacionadas, além de estabelecer forte sinal filogenético em filós animais. Ainda, possuem a sua volta sequências conservadas que favorecem seu isolamento para os estudos (Tresbach *et al.*, 2015).

4. OBJETIVOS

Artigo 1: Filogeografia da espécie de peixe miniatura *Fluviphylax simplex* (Cyprinodontiformes: Fluviphylacidae) ao longo da Região Hidrogeográfica Amazônica.

4.1. Geral

Determinar a área de distribuição de *Fluviphylax simplex*, por meio da identificação de espécimes em coleções ictiológicas e do sequenciamento de um marcador de evolução rápida, o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI).

4.2. Específicos

- i) Descrever os padrões de colorido de *Fluviphylax simplex*;
- ii) Compreender a variabilidade intra e interpopulacional de *F. simplex*, a partir do sequenciamento do gene mitocondrial COI, e estabelecer, por meio da rede de haplótipos e análise da variabilidade genética, a conectividade entre as diferentes populações;
- iii) Interpretar os padrões filogeográficos pela abordagem comparativa com os padrões conhecidos para outros organismos (espécies/gêneros) de distribuição semelhante.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, J.S.; TAGLIACOLLO, V.A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical freshwater fishes. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 51, p. 27-53, 2020.
- AMORIM, P.F.; COSTA, W. J. E. M. Multigene phylogeny supports diversification of four-eyed Fishes and one-sided livebearers (Cyprinodontiformes: Anablepidae) related to major South American geological events. **PLoS ONE**, v. 13, n.6, 2018.
- AMORIM, P.F.; COSTA, W.J.E.M. Evolution and biogeography of *Anablepsoides* killifishes shaped by Neotropical geological events (Cyprinodontiformes, Aplocheilidae). **Zoologica Scripta**, p. 1-13, 2022.
- ANTONELLI, A. *et al.* Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 115, n. 23, p. 6034-6039, 2018.
- AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v.36, n.1, p.3–15, 2009.
- AVISE, J.C. **Phylogeography**: the story and formation of the species. Harvard, Harvard University Press, 2000.
- AZEVEDO, P.B.; BATISTA, J.S.; FORMIGA, K.M. Código de barras de DNA para identificação de peixes da família Loricariidae (Siluriformes) do rio Araguaia. *In*: IV Congresso de Iniciação Científica do INPA-SONIC, 2015. **Anais [...]**. Manaus: INPA, 2015, p.282-285.
- BLOOM, D.D.; LOVEJOY, N.R. On the origins of marine-derived freshwater fishes in South America. **Journal of Biogeography**, v. 4, p. 1927-1938, 2017.
- BORGHEZAN, E.A. *et al.* A review on fish sensory systems and Amazon water types with implications of biodiversity. **Front. Ecol. Evol.**, v.8, 2021.
- BRAGANÇA, P.H.N. *Fluviphylax gouldingi* and *F. wallacei*, two new miniature killifishes from the middle and upper Rio Negro drainage, Brazilian Amazon. **Spixiana**, Munique, v.41, n.1, p.133-146, 2018.
- BRAGANÇA, P.H.N.; AMORIM, P.F.; COSTA, W.J.E.M. Pantanodontidae (Teleostei, Cyprinodontiformes), the sister group to all other cyprinodontoid killifishes as inferred by molecular data. **Zoosystematics and Evolution**, v.94, p.137–145, 2018.
- BRAGANÇA, P.H.N.; COSTA, W.J.E.M. Time-calibrated molecular phylogeny reveals a Miocene–Pliocene diversification in the Amazon miniature killifish genus *Fluviphylax* (Cyprinodontiformes: Cyprinodontoidei). **Organisms, Diversity and Evolution**, v.18, p.345–353, 2018.
- BRAGANÇA, P.H.N.; COSTA, W.J.E.M. Multigene fossil-calibrated analysis of the African lampeyes (Cyprinodontoidei: Procatopodidae) reveals an early Oligocene origin and Neogene

diversification driven by palaeogeographic and palaeoclimatic events. *Organisms, Diversity and Evolution*, v.19, p. 303–320, 2019.

BUCKUP, P.A. Taxonomia e filogenia de peixes de riachos brasileiros. *Oecologia Australis*, v. 25, n. 2, 197-230, 2021.

CARDOZO, M.; DINIZ, M.B.; SZLAFSZTEIN, C.F. Os serviços ecossistêmicos dos recursos hídricos da Bacia Amazônica como Bens Públicos Globais. *Água y Territorio*, v. 21, p. 103-119, 2023.

CASSEMIRO, F.A.S. *et al.* Landscape dynamics and diversification of the megadiverse South American freshwater fish fauna. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.120, n.2, 2023. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2211974120>. Acesso em: 14 mar. 2023.

COSTA, W.J.E.M. Relationships, monophyly and three new species of the neotropical miniature poeciliid genus *Fluviophylax* (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, v. 7, n. 2, p. 111-130, 1996.

COSTA, W.J.E.M. Oligocene Killifishes (Teleostei: Cyprinodontiformes) from southern France: relationships, taxonomic position, and evidence of internal fertilization. *Vertebrate Zoology*, v. 62, n. 3, p. 371-386, 2012.

COSTA, W.J.E.M.; LE BAIL, P.Y. *Fluviophylax palikur*: a new poeciliid from the Rio Oiapoque Basin, Northern Brazil (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae), with comments on miniaturization in *Fluviophylax* and other neotropical freshwater fishes. *Copeia*, p.1027–1034, 1999.

EBACH, M.C.; HOLDREGE, C. More taxonomy, not DNA barcoding. *BioScience*, v. 55, p. 822-823, 2005.

FILIZOLA, N.; GUYOT, J.L. Fluxo de sedimentos em suspensão nos rios da Amazônia. *Revista Brasileira de Geociências*, v.41, n.4, p.566-576, 2011.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. Eschemeyer's catalog of fishes: Genera/species by family/subfamily. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em: 13 dez. 2023.

HANKEN, J.; WAKE, D.B. Miniaturization of body size: Organismal Consequences and Evolutionary Significance. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 24, 501-519, 1993.

HELMSTETTER, A.J. *et al.* Viviparity stimulates diversification in an order of fish. *Nature Communications*, v. 7, p. 1-7, 2016.

LEAL, W.M.M.; FREITAS, C.E.C.; SIQUEIRA-SOUZA, F.K. Diversidade de peixes em lagos manejados em área de várzea Amazônica brasileira. *Scientia Amazonia*, v.7, n.1, p.1-10, 2018.

LEITÃO, R.P. *et al.* Rare species contribute disproportionately to the functional structure of species assemblages. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 283, p. 20160084, 2016.

LIMA, R.C. *et al.* Identification of fish specimens of the Tocantins River, Brazil, using DNA barcoding. **Journal of Fish Biology**, v. 104, n. 6, p. 1-16, 2024.

Lowe-McConnell, R.H. **Ecological Studies in Tropical Fish Communities**. Cambridge University Press, p.382, 1987.

MENIN, M. Amazônia: diversidade biológica e história geológica. UFAM: Amazonas, 2016.

MONTANHER, O.C. Modelos empíricos para estimativa da concentração de sedimentos em suspensão em rios amazônicos de águas brancas a partir de imagens Landsat 5. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 145 p. 2013.

MORALES, P. *et al.* Genomes of the Orestias pupfish from the Andean Altiplano shed light on their evolutionary history and phylogenetic relationships within Cyprinodontiformes. **BMC Genomics**, v. 25, n. 614, p. 16, 2024.

OTTONI, F.P.; SOUTH, J.; AZEVEDO-SANTOS, V. M.; HENSCHER, E.; BRAGANÇA, P.H.N. Editorial: Freshwater biodiversity crisis: Multidisciplinary approaches as tools for conservation. **Front. Environ. Sci.**, 2023.

PAGE, T.J.; HUGHES, J.M. Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes. **Journal of Fish Biology**, 77: 2093-2122, 2010.

PELICICE, F.M. *et al.* Human impacts and the loss of Neotropical freshwater fish diversity. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 3, 2021.

POHL, M.; MILVERTZ, F. C.; MEYER, A.; VENCES, M. Multigene phylogeny of cyprinodontiform Fishes suggests continental radiations and a rogue taxon position of *Pantanodon*. **Vertebrate Zoology**, v. 65, p. 37-44, 2015.

REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South American. **Journal of Fish Biology**, v. 89, p. 12–47, 2016.

RIBAS, C.C.; D'HORTA, F.M. Filogeografia, Uso de padrões espaciais e temporais de diversificação recente para testar hipóteses biogeográficas. *In*: CARVALHO, C.B.J.; ALMEIDA, E. **Biogeografia da América do Sul: Análise de tempo, espaço e forma**. São Paulo: Roca, 2016. p. 129-139.

ROBERTS, T.R. Ecology of Fishes in the Amazon and Congo Basins. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, Harvard University, v.143, p.117-1147, 1972.

ROSS, J.L.S.; PRETTE, M.E.D. Recursos hídricos e as bacias hidrográficas: âncoras do

planejamento e gestão ambiental. **Revista do Departamento de Geografia**, v. 12, p. 89-121, 1998.

SANTOS, O.C.O. A geografia física e as bacias hidrográficas na Amazônia. **Revista GeoAmazônia**, Belém, n. 2, v. 1, p. 17 - 27, 2014.

SATOH, T.P. *et al.* Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. **BMC Genomics**, v. 17, n. 719, 2016.

SILVA, M.S.R. *et al.* Química das águas de superfície dos rios da bacia Amazônica: uma contribuição para classificação de acordo com seus usos preponderantes. *In: XIX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos*, 2011, Maceió. **Anais [...]**. Maceió: - , 2011, p. 1-11.

SILVA, M.S.R. Classificação dos rios da Amazônia: uma estratégia para preservação desses recursos. **Holos Environment**, v. 13, n. 2, p. 163-174, 2013.

SIOLI, H.S.L. Das Wasser in Amazonasgebiet. **Forsh. Fortscher**, v. 26, p. 274-280, 1950.

SOUZA, E.R. **Filogeografia do gênero neotropical *Fluviphylax* (Ciprinodontiformes: Poeciliidae) das bacias do Amazonas e Orinoco**. 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

SOUZA, E.R. *et al.* Comparative cytogenetics of two of the smallest Amazonian fishes: *Fluviphylax simplex* Costa, 1996 and *Fluviphylax zonatus* Costa, 1996 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). **Comparative Cytogenetic**, v. 5, n. 5, p. 411–422, 2011.

TRESBACH, R.H. *et al.* Dna barcoding: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 2, p. 77-81, 2015.

TURCHETTO-ZOLET, A.C. *et al.* **Guia prático de análises filogenéticas**. Sociedade Brasileira de Genética, 2013.

VAL, P. *et al.* Landscape evolution as a diversification driver in freshwater fishes. **Front. Ecol. Evol.**, 2022.

CAPÍTULO II

Artigo 1: FILOGEOGRAFIA DA ESPÉCIE DE PEIXE MINIATURA *Fluviophylax simplex* (CYPRINODONTIFORMES: FLUVIPHYLACIDAE) AO LONGO DA REGIÃO HIDROGEOGRÁFICA AMAZÔNICA

Dhallyth Zainny Pereira Silva¹, Felipe Polivanov Ottoni², Pedro Henrique Negreiros Bragança^{3,4}

¹ Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação, Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, 65080-805, São Luís, MA, Brazil. zainesilva0799@gmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-9714-8225> (autor correspondente).

² Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências de Chapadinha, Campus de Chapadinha, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, BR-222, KM 04, Boa Vista, CEP: 65500-000, Chapadinha, Brazil. fpottoni@gmail.com.

³ Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Av. dos Portugueses, 1966, CEP: 65085-580, São Luís, Brazil. pedrobra88@gmail.com.

⁴ Department of Ichthyology, American Museum of Natural History, Central Park West, 10024, New York, USA. pbraganca@amnh.org.

RESUMO

Fluviophylax simplex é uma espécie de peixe miniatura encontrada em rios de águas claras ou pretas nas calhas norte e sul do rio Amazonas, desde a região próxima à foz do rio Tapajós, até a região de Tefé (rio Solimões). Este trabalho investiga o padrão filogeográfico das populações de *F. simplex* na região hidrogeográfica amazônica, através do sequenciamento de um fragmento (600 bp) do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de 21 indivíduos da espécie ao longo da sua distribuição. As análises revelam elevada variabilidade e estruturação genética ($F_{st}=0,78$), além de equilíbrio demográfico. A espécie *F. simplex* foi registrada pela primeira vez no médio rio Negro próximo à Santa Isabel do Rio Negro, indicando a provável existência de uma conexão entre as cabeceiras de tributários do rio Solimões e do rio Negro. Esse resultado indica que espécies de pequeno porte e com aparentes limitações de dispersão podem ter uma grande distribuição. O trabalho discute os diferentes meios pelos quais essa conectividade é possivelmente mantida: por meio das inundações das áreas de várzea e/ou movimento lateral pelas cabeceiras em áreas de floresta.

Palavras-chave: COI, Distribuição, Fluxo gênico, Rio Negro, Rio Solimões

INTRODUÇÃO

Os aspectos filogeográficos apresentam-se como mecanismos indispensáveis para o

conhecimento acerca das associações históricas entre populações de uma determinada espécie (Silva e Garda, 2011). Dessa forma, a filogeografia é uma disciplina pautada na diversidade genética e distribuição dos indivíduos, a partir do uso de marcadores moleculares (Avisé, 2009). A maior parte dos estudos com peixes de água doce da Amazônia teve como alvo espécies maiores, com maior capacidade de dispersão e importância direta para a dieta das populações locais, a exemplo da dourada, *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) e do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Batista, 2010; Melo *et al.*, 2020). Apesar do grande número de estudos filogeográficos investigando os padrões de distribuição em diferentes organismos amazônicos e aspectos genéticos das populações, poucos abordam padrões filogeográficos em espécies de peixes de pequeno porte e, muito menos, em espécies miniaturas.

A região amazônica possui um grande número de peixes miniaturas que, de acordo com Weitzman e Vari (1988), são aqueles em que os adultos não ultrapassam 26.0 mm de comprimento padrão (CP), ou que atingem a maturidade sexual com menos de 20 mm de CP (Costa e Le Bail, 1999; Toledo-Piza *et al.*, 2014). Estudos recentes sugerem que espécies miniaturas desempenham papéis ecológicos fundamentais para o funcionamento do ecossistema (Leitão *et al.*, 2016; Perkins *et al.*, 2022).

As espécies miniaturas estão geralmente associadas à micro-habitats específicos, vide áreas com densa cobertura vegetal, águas sem grande aporte de sedimentos/nutrientes e ambientes de água parada ou com pouca movimentação (Weitzman e Vari, 1988; Perkins *et al.*, 2022). Dessa forma, apesar de nenhum estudo ter sido feito até o momento, espécies miniaturas são ótimas candidatas para a investigação de padrões filogeográficos e biogeográficos.

Nesse cenário de carência informacional acerca dos padrões filogeográficos de espécies miniaturas amazônicas estão as do gênero *Fluviphylax* Whitley 1965. O gênero possui oito espécies, todas ocorrendo na bacia Amazônica e/ou no Orinoco: *F. pygmaeus* (Myers & Carvalho, 1955), *F. simplex* Costa, 1996, *F. obscurus* Costa, 1996, *F. zonatus* Costa, 1996, *F. palikur* Costa & Le Bail, 1999, *F. wallacei* Bragança, 2018, *F. gouldingi* Bragança, 2018 e, mais recentemente, *F. rubens* Huber 2024. *Fluviphylax* foi diagnosticado pela presença de 15 sinapomorfias definidas por Costa (1996): (i) redução do tamanho corporal, (ii) olhos extremamente grandes, (iii) redução do processo dorsal da maxila, (iv) vômer ausente, (v) cartilagem interarcual ausente, (vi) quarto ceratobranquial sem dentes, (vii) quinto ceratobranquial curto e dobrado lateralmente na porção anterior, (viii) interhial ausente, (ix)

alongamento da cartilagem basihial, (x) região anterior do opérculo com um processo estreito, (xi) pós-temporal em formato de foice, (xii) redução do sistema sensorial cefálico, (xiii) 17-20 raios na nadadeira caudal, (xiv) 7-10 raios na nadadeira anal e (xv) concentração de melanóforos na metade ventral e dorsal do corpo.

As espécies de *Fluviophylax* habitam ambientes caracterizados por águas de fluxo lento e são nadadores de superfície (Costa e Le Bail, 1999). De acordo com os poucos estudos ecológicos com o gênero, as espécies apresentam um hábito alimentar denominado neustofagia, isto é, alimentam-se exclusivamente de pequenos artrópodes na lâmina d'água (Leitão *et al.*, 2016). O papel envolvido nesse tipo de alimentação, baseada em pequenos artrópodes terrestres que caem das copas das árvores em sistemas com baixo aporte de nutrientes, provavelmente contribui para a transferência de biomassa na rede trófica.

A partir de informações de campo, é possível observar alguns padrões bem definidos. Nenhum indivíduo foi coletado em águas barrentas e com sedimentos, como o encontrado na calha dos rios Solimões e Amazonas, conhecidos pelo grande aporte de sedimentos andinos (Pedro H. N. Bragança, 2023, comunicação pessoal). No entanto, as espécies *F. simplex* e *F. pygmaeus* encontram-se amplamente distribuídas nas bacias do Amazonas/Solimões e Madeira, respectivamente, conhecidas pelo grande aporte de sedimentos. Elas estão restritas, porém, a pequenos córregos de água com baixíssimo nível de sedimentos em meio à densa vegetação.

O presente projeto tem como foco *Fluviophylax simplex*, uma espécie que apresenta como característica autapomórfica a presença de neuromastos expostos, presentes em calhas na região cefálica (Costa, 1996). *Fluviophylax simplex* apresenta a mais ampla distribuição dentre as espécies do gênero, já que ocorre ao longo da calha do rio Amazonas e do Solimões, desde a parte baixa próxima à foz do rio Tapajós e Trombetas, até a região de fronteira entre o Brasil e a Colômbia/Peru, ocorrendo em muitos tributários do Amazonas (rios Tapajós, Trombetas e Purus).

Dentro desse contexto, o trabalho buscou entender se uma espécie miniatura especializada em ambientes lênticos e de águas com poucos sedimentos mantém fluxo genético ao longo de toda a sua distribuição, incluindo entre as margens norte e sul do Amazonas/Solimões. A partir disso, será possível identificar as rotas de conexão entre as diferentes populações e, talvez, descrever os padrões encontrados como modelos e uma referência para estudos semelhantes com peixes de pequeno porte, muitos deles com grande

potencial para a aquariofilia e de grande importância ecológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras. 21 espécimes de *Fluviphylax simplex* foram sequenciados e estão depositados nas seguintes coleções brasileiras: Laboratório de Sistemática e Evolução de Peixes Teleósteos, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LASEPT-UFRJ), Laboratório de Ictiologia de Sorocaba, da Universidade Federal de São Carlos (LISO-UFSCar), Coleção de Recursos Genéticos, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CRG-INPA), Coleção Ictiológica do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, da Universidade Federal do Maranhão (CICCAA-UFMA) e Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, do Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista (IB-UNESP). A distribuição geográfica desses indivíduos está disposta na Fig. 1.

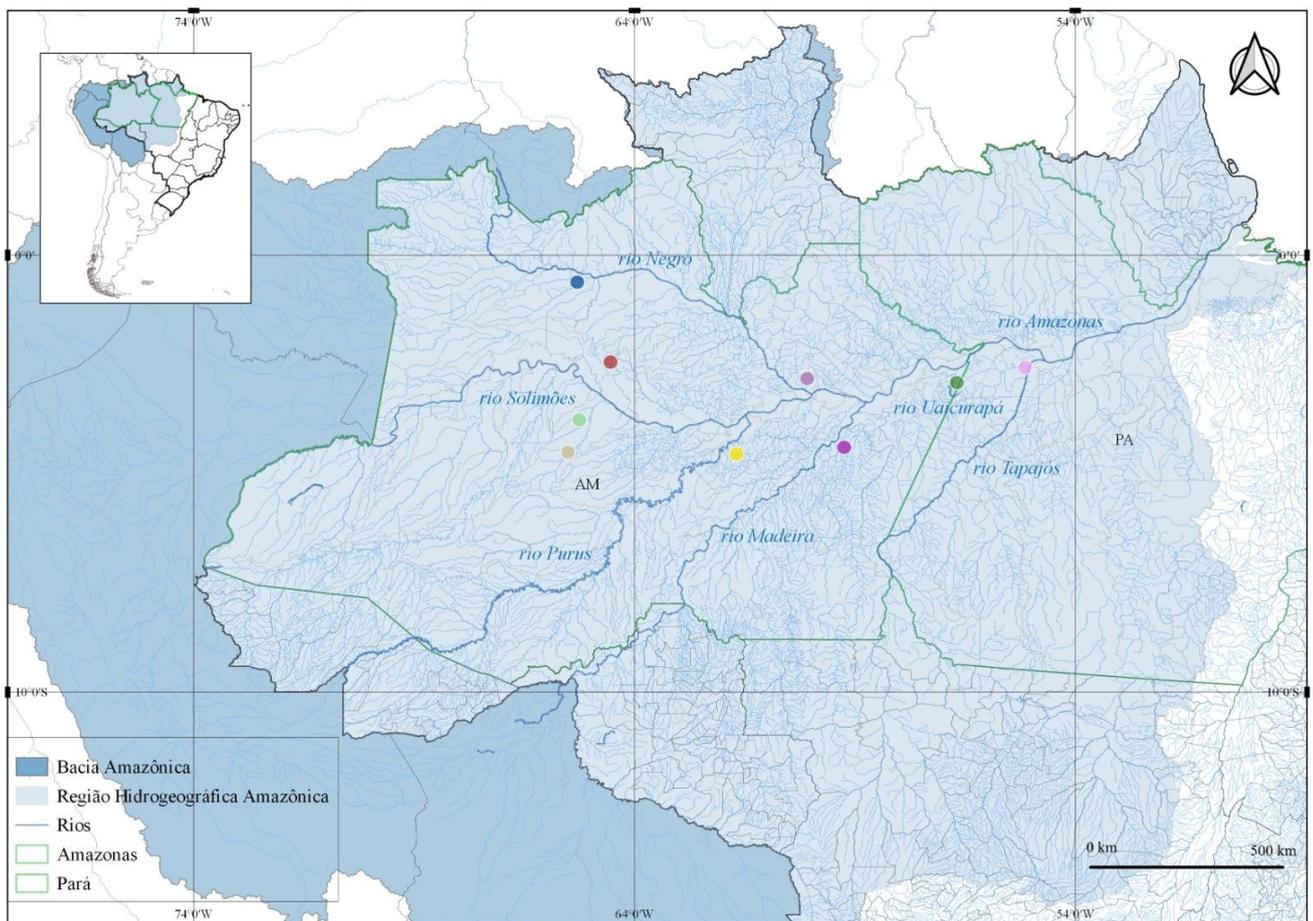


FIGURA 1. Pontos de coleta de *Fluviphylax simplex* obtidos de coleções ictiológicas do Brasil. As cores representam os municípios onde os indivíduos foram coletados: azul indica Santa Isabel do Rio Negro, marrom indica Maraã, nude indica Tefé, verde claro indica Alvarães, amarelo indica Beruri, roxo indica Manaus, violeta indica Borba, verde escuro indica Parintins e rosa indica Santarém.

Extração de DNA, PCR e sequenciamento. O DNA foi obtido a partir do tecido muscular do lado direito do pedúnculo caudal utilizando o *kit* Extract-N-Amp™ Tissue PCR (Sigma), reduzindo as quantidades dos reagentes apresentadas no protocolo do fabricante à 1/4. Em seguida, a qualidade das amostras de DNA foi verificada a partir de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com GelRed (Sigma). A reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar o gene mitocondrial Citocromo c oxidase I (COI) com os seguintes *primers*: LCO1498 5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G- 3' e HCO2190 5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3' (Folmer *et al.*, 1994).

A PCR foi realizada em 10 µl contendo 4,2 µl de água de injeção, 4,0 µl de RedMix (Sigma), 0,4 µl de cada *primer* (concentração final de 10µM) e 1 µl de DNA. O perfil de amplificação seguiu as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos, que incluem desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 48°C por 1 minuto e extensão inicial a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, além da extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto do PCR foi quantificado e sequenciado em direção *forward* pela empresa ACTGENE Ltda., Porto Alegre, Brazil.

Análise genética. Os eletroferogramas das sequências obtidas foram analisados individualmente de modo a confirmar a presença de cada nucleotídeo, e permitir a composição do banco de dados no programa BioEdit (Hall, 1999). As sequências foram editadas e alinhadas seguindo o alinhamento automático com o uso do aplicativo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), o qual está implementado no próprio BioEdit.

Nos programas DnaSP v.6 (Rozas *et al.*, 2017) e Arlequin v. 3.5.2.2 (Excoffier e Lischer, 2010) foram acessadas informações acerca da diversidade genética inter e intrapopulacional, por meio dos índices de diversidade haplotípica (h – a frequência e o número de haplótipos entre os indivíduos) e diversidade nucleotídica (π – estimativa de divergência entre as sequências) (Nei, 1987).

Para avaliar a relação filogenética a partir do DNA mitocondrial dos haplótipos, foi utilizado o programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012). A espécie *Fluviphylax pygmaeus* (GenBank, acesso: MG451923.1), que é irmã de *Fluviphylax simplex* com base em dados morfológicos (Costa 1996) e moleculares (Bragança e Costa, 2018), foi utilizada como grupo externo. A Análise Bayesiana foi executada por meio de duas análises independentes de quatro

cadeias de Markov/Monte Carlo (MCMC), com um total de 3 milhões de gerações e árvores amostradas a cada 1000 gerações. Foi realizado um *burn-in* de 25%. A qualidade das cadeias de MCMC e a estabilização da análise foi inferida no programa Tracer 1.6 pela análise dos valores de ESS.

Como método de delimitação das espécies a partir da distância genética, foi utilizado o BINs (*Barcode Index Numbers*) presente na plataforma BOLD (*Barcode of Life Data System*) que considera a variação intraespecífica inferior a 3%. Em relação ao gene COI, considera-se que divergências genéticas acima desse valor são indicativos de espécies diferentes (Ratnasingham e Hebert, 2013).

Uma rede de haplótipos foi executada no programa PopArt 1.7 (Leigh e Bryant, 2015) e editada manualmente no aplicativo Inkscape 1.3.2 (<https://inkscape.org/pt/release/inkscape-1.3.2/windows/64-bit/msi/?redirected=1>). No programa Arlequin v. 3.5.2.2 também foram estimados testes de neutralidade F_s de F_u (Fu, 1997) e D de Tajima (Tajima, 1989). Esses testes avaliam a distância da neutralidade (equilíbrio mutação-deriva), que é esperado para o modelo de expansão demográfica e tem expressão por meio de valores negativos.

Adicionalmente, a análise da distribuição *mismatch* foi utilizada para avaliar a distribuição de diferenças entre pares de haplótipos. Quando o gráfico apresenta padrão unimodal, há indicativo de expansão populacional recente, mas as distribuições irregulares indicam populações estacionárias por longo tempo (Harpending, 1994). A validade desse modelo de expansão populacional foi testada a partir da soma dos desvios quadrados (SSD) e do índice de irregularidade de Harpending (Harpending, 1994). Por fim, as distâncias genéticas entre as populações foram calculados o F_{st} pareado e a Análise da Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foi utilizada para descrever a estrutura genética das populações.

Para os dados observados nas relações entre as populações e história demográfica, foram analisados dois *datasets*, um com 600 pares de bases (pb) e outro com 502 (redução de 16,3%).

RESULTADOS

Caracterização da diversidade genética à nível intrapopulacional. Fragmentos de COI com 600 pb de comprimento foram obtidos a partir do sequenciamento de 21 indivíduos de *Fluviphylax simplex*, como detalhado na Tab. 1. Os resultados apontam para 26 sítios polimórficos, dos quais 2 são *singleton* e 24 informativos para análises de parcimônia.

TABELA 1. Amostragem de *Fluviphylax simplex* considerando cada localidade. SO = rio Solimões (Alvarães, Tefé e Maraã); PU = rio Purus (Beruri); NE = rio Negro (Santa Isabel do Rio Negro e Manaus); TA = rio Tapajós (Santarém); UA = rio Uaicurapá (Parintins).

Município/População	Rios				
	SO	PU	NE	TA	UA
Alvarães (SA)	4	-	-	-	-
Tefé (ST)	1	-	-	-	-
Maraã, lago Amanã (SM)	2	-	-	-	-
Beruri (PB)	-	3	-	-	-
Santarém (TS)	-	-	-	3	-
Santa Isabel do Rio Negro (NS)	-	-	2	-	-
Parintins (UP)	-	-	-	-	5
Manaus (NM)	-	-	1	-	-

A composição nucleotídica das populações de *Fluviphylax simplex* estão apresentadas na Tab.2. Além disso, um total de 13 mutações foram evidenciadas nas sequências, sendo 11 do tipo transição (quando há troca de uma purina por purina, ou pirimidina por pirimidina) e 2 do tipo transversão (quando a troca é entre uma purina e uma pirimidina, ou vice-versa), não houve evidências de mutações do tipo indel (inserção-deleção). A partir dessa análise, ainda, o número de haplótipos obtidos foi 12. Os valores de diversidade genética global registrados para a espécie foram $H_d = 0,9381$ e $\pi = 0,0150$.

TABELA 2. Composição nucleotídica de cada população ao longo da distribuição de *Fluviphylax simplex*. P= população; N (%) = valor relativo da composição nucleotídica. A= adenina; T= timina; G= guanina; C= citosina; UP= rio Uaicurapá, Parintins; TS= rio Tapajós, Santarém; NM= rio Negro, Manaus; NS= rio Negro, Santa Isabel do Rio Negro; SM= rio Solimões, Maraã; SA= rio Solimões, Alvarães; ST= rio Solimões, Tefé; PB= rio Purus, Beruri.

P/N (%)	UP	TS	NM	NS	SM	SA	ST	PB
A	33.55	46.15	25.6	41.94	26.23	29.03	29.03	23.66
T	30.97	19.23	30.2	22.58	29.51	22.58	29.03	30.11
G	13.55	7.69	16.5	6.45	21.31	22.58	19.35	19.35
C	21.94	26.93	27.8	29.03	22.95	25.81	22.58	26.88

Relações entre populações. A relação intrapopulacional de *Fluviphylax simplex*, a partir do método de Inferência Bayesiana (BI) é apresentada na Fig.2. Os dados sugerem que há similaridade genética entre os indivíduos de *F. simplex*, dado o curto comprimento dos ramos, indicando divergências menores que 3%. Isso fica mais claro quando a espécie irmã *Fluviphylax pygmaeus* é comparada, sendo possível observar um longo comprimento de ramo.

De acordo com a topologia resultante da análise do gene COI, o primeiro clado ($p=94$) compreende cinco dos doze haplótipos encontrados (H2, H3, H4, H10 e H11), evidenciando relacionamento próximo entre os indivíduos de *Fluviphylax simplex* de Uaicurapá (Parintins), Tapajós (Santarém) e Purus (Beruri). O segundo clado bem suportado ($p=100$) inclui os haplótipos de Tefé e Maraã (H5, H6 e H12) localizados no rio Solimões, Amazônia Oriental. O terceiro clado é composto apenas por um haplótipo também do rio Solimões, em Alvarães (H9) é suportado por 99% de probabilidade posterior. O quarto clado apresenta 86% de probabilidade posterior e indica a relação próxima entre os indivíduos da população do rio Uaicurapá (Parintins) (H1) e do rio Negro (Manaus) (H7). O clado representado pelos haplótipos do rio Negro, em Santa Isabel do Rio Negro (H8), mostra-se em posição basal com suporte estatístico de 63% de probabilidade posterior.

A rede de haplótipos (Fig.3) apresenta congruências com a topologia inferida a priori. O haplótipo H13 corresponde à espécie irmã *Fluviphylax pygmaeus*, cuja inserção não evidencia apenas a distância genética com *Fluviphylax simplex*, mas reforça que todos os indivíduos levantados nesse trabalho são realmente de *F. simplex*. Além disso, a análise com 502 pb obteve 12 haplótipos com informações consistentes com o analisado anteriormente, porém agora com claro compartilhamento de haplótipos entre as populações do rio Solimões de Tefé e Maraã (H6) (Fig.4).

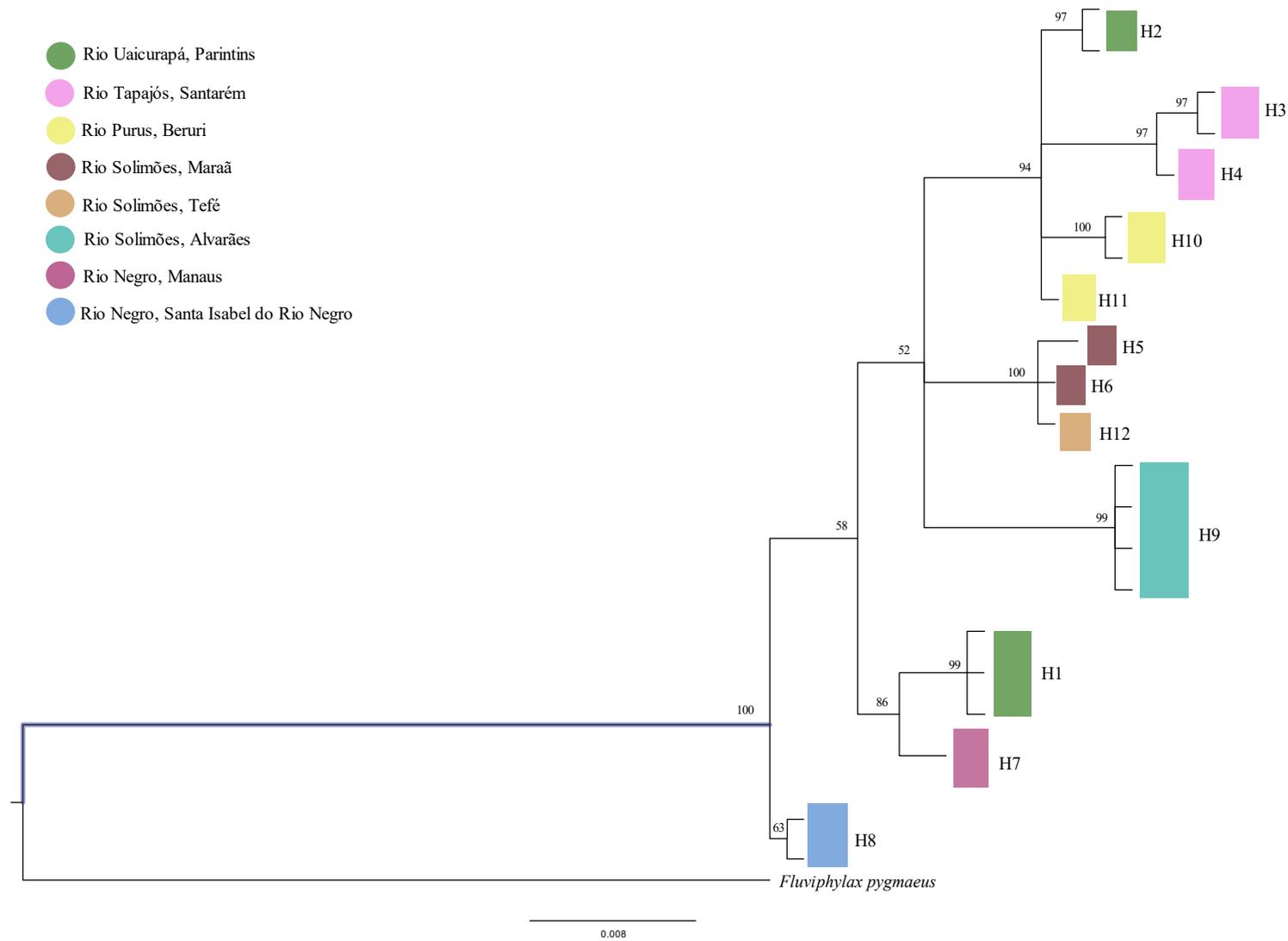


FIGURA 2. Árvore filogenética obtida pela análise de Inferência Bayesiana (BI) baseada na região Citocromo c oxidase I do DNA mitocondrial de *Fluviphylax simplex*. Os valores acima da barra são valores de probabilidade superior a 50%, a partir da análise de verossimilhança.

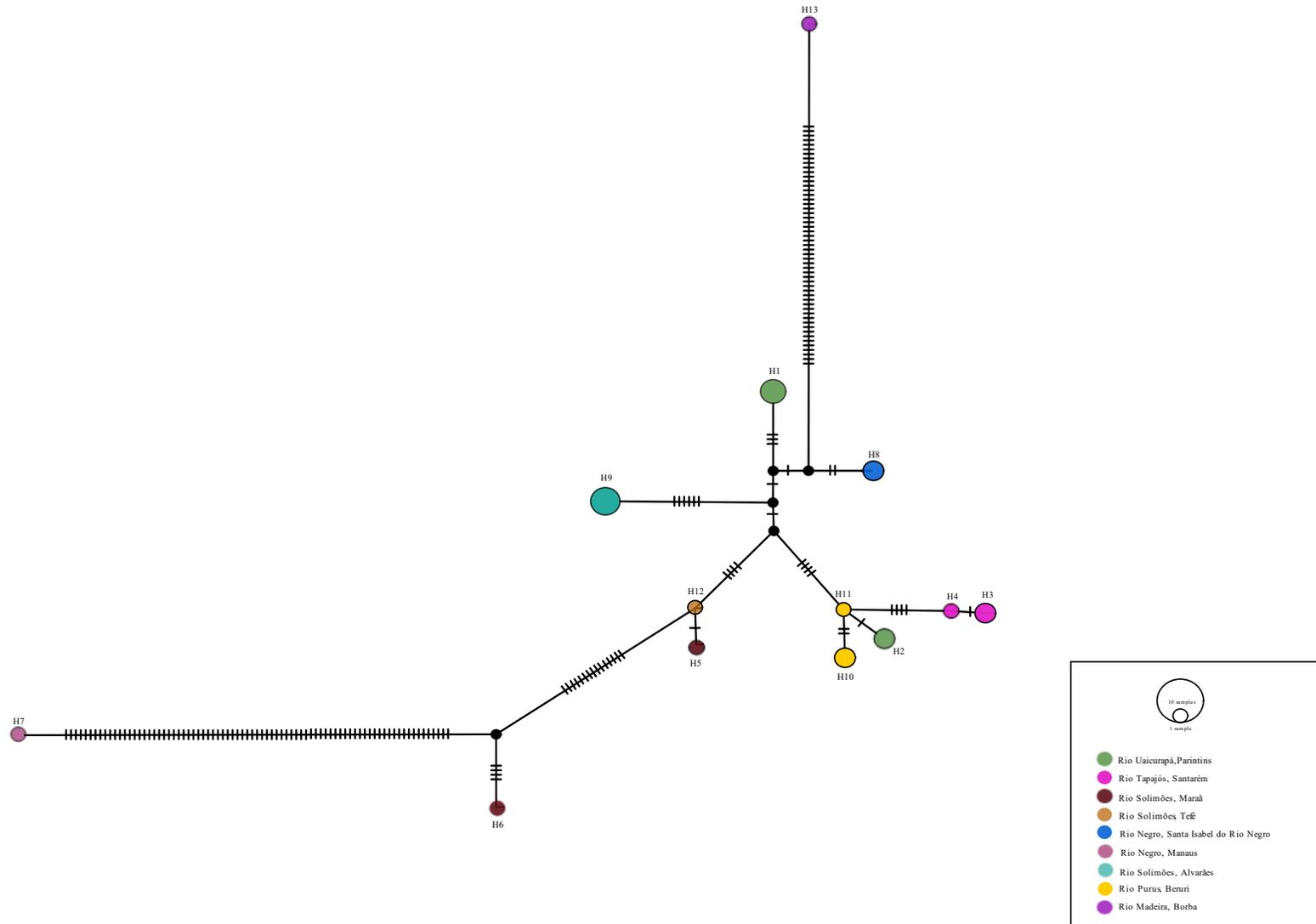


FIGURA 3. Rede de haplótipos de *Fluviphylax simplex* com o *dataset* completo (600 pares de bases). Os círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos e as cores dentro dos círculos correspondem às localidades. Os traços representam os passos mutacionais entre os haplótipos. Círculos pretos são pontos intermediários não encontrados (*missing haplotypes*).

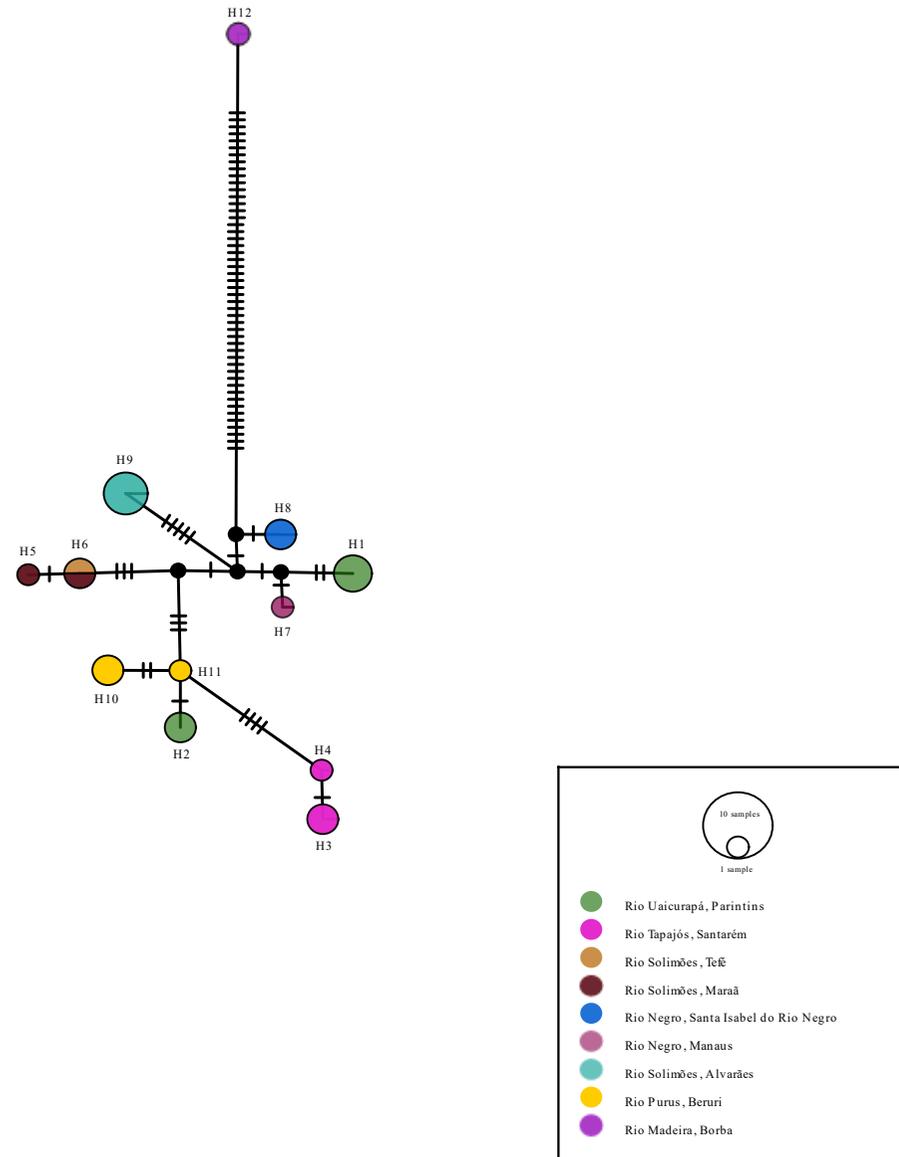


FIGURA 4. Rede de haplótipos de *Fluviphylax simplex* após o *trimming* das sequências (502 pares de bases). Os círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos e as cores dentro dos círculos correspondem às localidades. Os traços representam os passos mutacionais entre os haplótipos. Círculos pretos são pontos intermediários não encontrados (*missing haplotype*).

História demográfica. O gráfico de distribuição *mismatch* obtido a partir da análise do gene COI com 600 pb para as populações de *Fluviphylax simplex*, apresentou tendência multimodal (Fig. 5), o que sugere que a população evoluiu de acordo com as premissas do equilíbrio neutro por prolongado período de tempo, e os picos refletem as mutações ocorridas em diferentes cenários da história da população. Tal proposição é apoiada por grandes populações estáveis com base na diversidade genética, além de ser um padrão estatisticamente diferente do simulado para o modelo de expansão populacional (padrão unimodal).

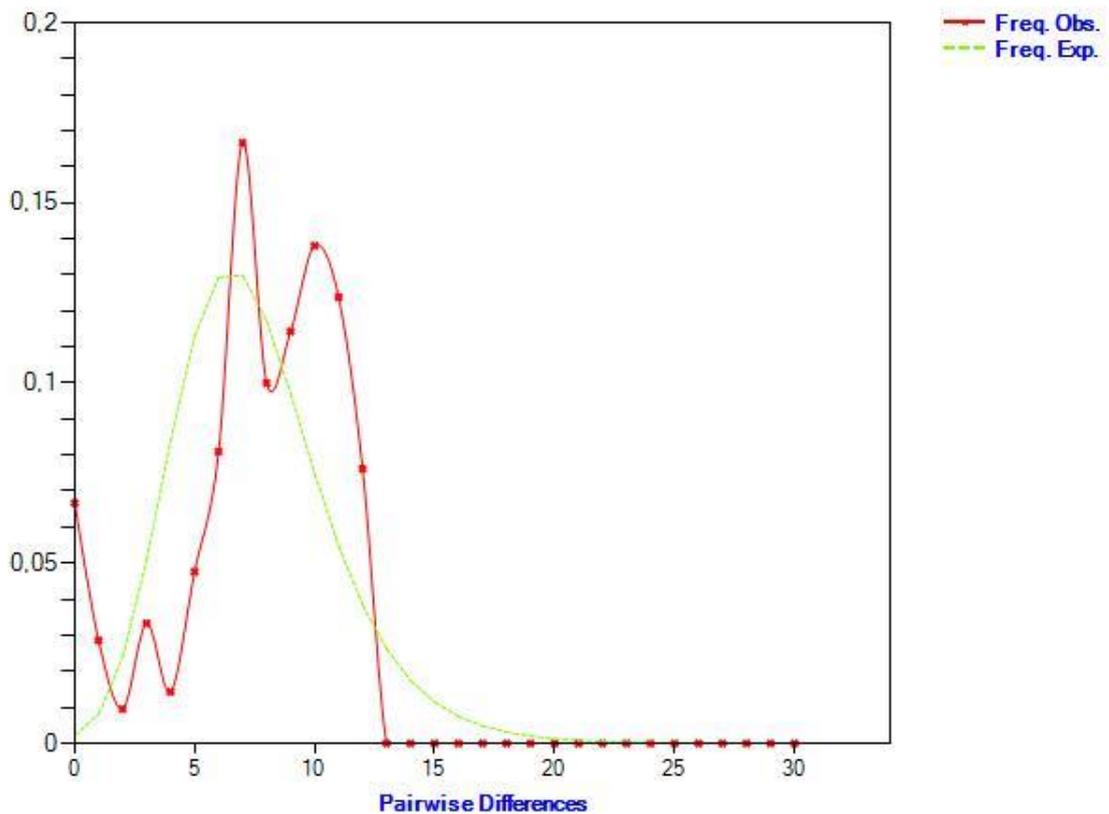


FIGURA 5. Distribuição das frequências de diferenças pareadas na região COI do mtDNA das seqüências com 600 pb de *Fluviphylax simplex* analisadas. A linha em verde representa a frequência esperada das diferenças pareadas entre os haplótipos estudados no modelo de expansão demográfica, enquanto a linha vermelha sinaliza a frequência observada. O eixo X representa o número de diferenças entre os haplótipos, enquanto o eixo Y representa a frequência de cada número de diferenças.

O modelo de expansão demográfica sinalizado pelos índices de *Ragdnness* ($r = 0,3044$) e *SSD* ($= 0,0963$) apresentam valores não significativos ($P > 0,05$), assim como os Testes de Neutralidade, *D* de Tajima ($= 0,2236$) e *F_s* de Fu ($= 0,8254$), que não apresentaram desvios significativos para a expectativa neutra de eventos mutacionais. Padrão semelhante é

apresentado pelo modelo de expansão demográfica performado com 502 pares de bases, em que os índices de *Raggness* ($r= 0,3044$) e *SSD* ($= 0,09477$) e os Testes de Neutralidade, *D* de Tajima ($0,2201$) e *F_s* de *F_u* ($0,74728$), não apresentam valores significativos ($P>0,05$). Esse cenário é indicativo de que não há expansão demográfica recente, o que concorda com o expresso pelo gráfico da *mismatch distribution*.

Estrutura populacional. A diferenciação genética entre os pares de populações analisando o gene *COI* com 600 pb foi metrificada com base no índice de fixação, o *F_{st}*. Para tanto, foram instituídos quatro grupos na análise AMOVA: as populações do rio Solimões em Alvarães, Tefé e Marañ, as populações do Amazonas/baixo rio Negro em Uaicurapá, Manaus e Santarém, a população do alto rio Negro, em Santa Isabel do rio Negro e a população do rio Purus, em Beruri.

O valor global de *F_{st}* corrobora para o indicativo de estrutura populacional ($F_{st}=0,78$; $P<0,05$). Quando comparadas par a par, fica evidente que grande parte das populações apresenta a tendência dos valores de *F_{st}* para indicativo de estrutura populacional, uma vez que eles estão acima de 0,25 (Wright, 1931), e valores significativos para tal dado são encontrados entre as populações de Tapajós e Uaicurapá e entre Solimões (Alvarães) e outras três populações: Uaicurapá, Tapajós e Purus (Tab. 3).

TABELA 3. Comparação par a par dos valores dos índices de fixação das populações de *F. simplex*. Os valores em negrito apresentam significância ($P<0,05$). UP= rio Uaicurapá, Parintins; TS= rio Tapajós, Santarém; NM= rio Negro, Manaus; NS= rio Negro, Santa Isabel do Rio Negro; SM= rio Solimões, Marañ; SA= rio Solimões, Alvarães; ST= rio Solimões, Tefé; PB= rio Purus, Beruri.

	UP	TS	NM	NS	SM	SA	PB	ST
UP	0.00	-	-	-	-	-	-	-
TS	0.62	0.00	-	-	-	-	-	-
NM	0.17	0.93	0.00	-	-	-	-	-
NS	0.44	0.96	1.00	0.00	-	-	-	-
SM	0.53	0.93	0.84	0.94	0.00	-	-	-
SA	0.73	0.97	1.00	1.00	0.97	0.00	-	-
PB	0.41	0.83	0.81	0.90	0.86	0.95	0.00	-
ST	0.37	0.94	1.00	1.00	1.00	1.00	0.84	0.00

Considerando os grupos indicados na AMOVA, a maior variação genética é evidenciada entre populações dentro dos grupos (74,19%), enquanto que 21,32% da variação está distribuída dentro das populações e 4,48%, entre os grupos. Os índices de fixação F_{st} , F_{ct} e F_{sc} são, respectivamente, 0,78 ($P=0,00$), 0,04 ($P=0,36$) e 0,77 ($P=0,00$). Valores elevados e significativos de F_{st} esclarecem a diferenciação genética em nível populacional dentro dos grupos. A variância entre os grupos, definidos por F_{ct} , não foi significativa (Tab. 4). É importante salientar que todos os valores relativos às análises com 502 pares de bases não são divergentes a ponto de modificar o cenário proposto para a estrutura populacional de *Fluviophylax simplex*.

TABELA 4. Resultados da análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) das sequências da região Citocromo c oxidase I de oito populações de *Fluviophylax simplex*. Os valores em negrito apresentam significância ($P<0,05$).

Fonte da variação	Componente de variação	Porcentagem de variação (%)
Entre grupos	0,21506	4,48
Entre populações dentro dos grupos	3,55973	74,19
Dentro das populações	1,02308	21,32
	$F_{st}= \mathbf{0,78}$	$F_{sc}= \mathbf{0,77}$ $F_{ct}= 0,04$

Descrição do padrão de colorido em vida de *Fluviophylax simplex*. A análise do padrão de colorido em vida de diferentes indivíduos de *Fluviophylax simplex* coletados ao longo da sua ampla distribuição, revelou a manutenção de um padrão de colorido característico da espécie. Esse padrão é aqui descrito pela primeira vez.

A coloração do corpo dos machos é verde-amarelo-prateado com cromatóforos dispersos ao longo do corpo, em especial na região supraorbital e opercular. Região ventral hialina e levemente esverdeada desde a base da nadadeira pélvica à base do pedúnculo caudal. Coloração em tonalidades de marrom-amarelo na região supraorbital e que se estende como uma faixa até a base do pedúnculo caudal. Faixa amarronzada abaixo da linha lateral, desde a linha média do corpo até a base do pedúnculo caudal. Região opercular de coloração marrom. Coloração verde brilhante na região infraorbital até a base da nadadeira pélvica. Íris amarela ou

alaranjada com borda superior prateada. Nadadeira peitoral transparente. Nadadeiras dorsal, caudal, pélvica e anal com faixas amareladas intercaladas com faixas transparentes. Margem preta nas nadadeiras caudal, dorsal e anal. Nadadeira caudal 8 a 9 pontos de coloração preta (Fig. 6A-F).

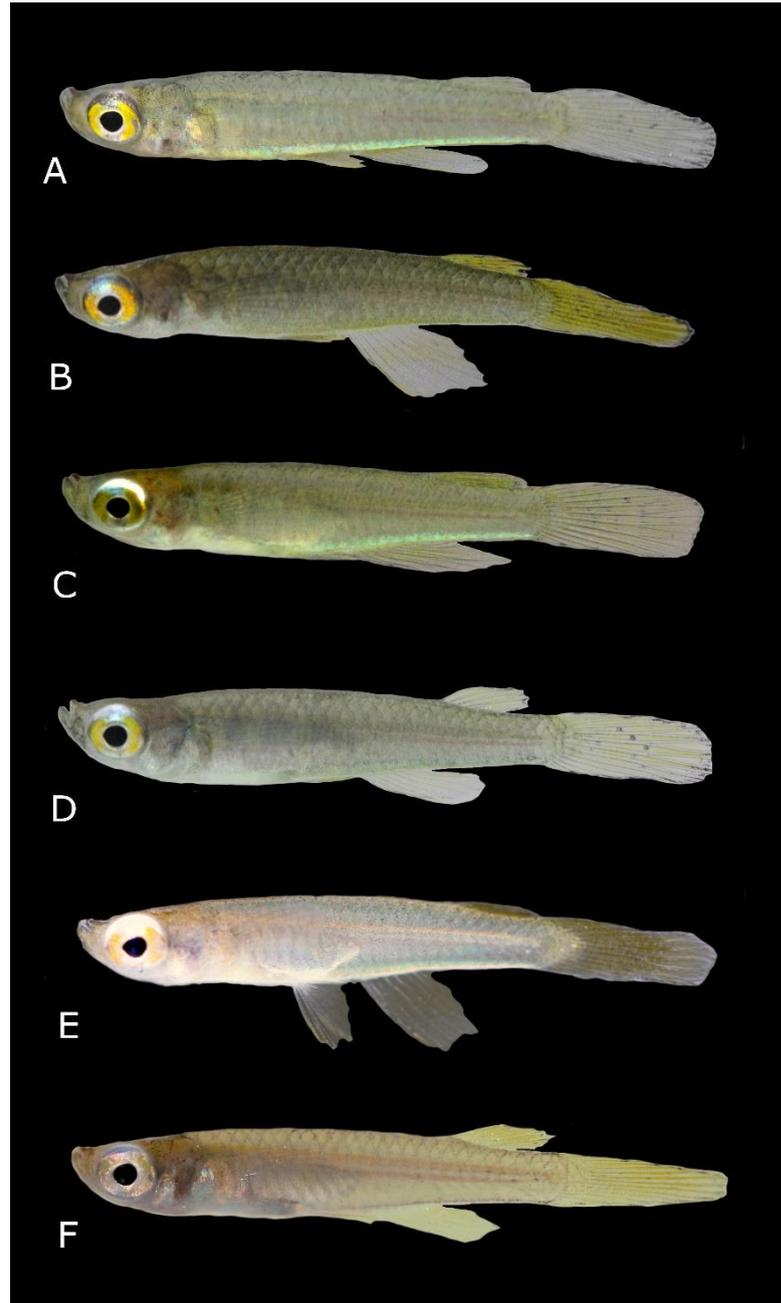


FIGURA 6. Padrão do colorido em via de machos da espécie *Fluviphylax simplex* ao longo de sua ampla distribuição, nas localidades de (A) Alter do Chão, Tapajós, (B) Ariau, baixo rio Negro, (C) Beruri, rio Purus, (D) Solimões, Manacapuru, (E) Tibarrá, Santa Isabel do Rio Negro, alto rio Negro, (F) Parintins.

DISCUSSÃO

A variabilidade genética de uma espécie é um parâmetro biológico fundamental para sua manutenção e conservação, a qual está relacionada à variação alélica e genotípica dentro da população (Hercos *et al.*, 2017). A elevada diversidade haplotípica ($Hd = 0,9381$) observada globalmente em *Fluviophylax simplex* indica alta variabilidade genética demonstrando maior proporção de haplótipos dentro das populações. Já a diversidade nucleotídica baixa ($\pi = 0,0150$) é consistente com a origem relativamente recente da espécie no final do Mioceno, há aproximadamente 6,5 milhões de anos (Bragança e Costa, 2018). A similaridade genética entre os indivíduos levantados neste trabalho confirma que todas as amostras são de *F. simplex*, com distância genética abaixo de 3%. Tanto a análise de Inferência Bayesiana (Fig.2), quanto as redes de haplótipos (Figs.3-4) conseguem esclarecer esse fato e demonstram a maior distância genética com sua espécie irmã, *Fluviophylax pygmaeus*.

Apesar do reduzido número, as populações com maior número de indivíduos amostrados fornecem *insights* acerca do fluxo gênico e vagilidade dessa espécie de peixe miniatura endêmica da região amazônica. A amostra de *F. simplex* no rio Negro, no município de Manaus (baixo rio Negro) confirma sua presença na região e a sua distribuição em simpatria com outra espécie do gênero, *F. zonatus*, distribuição essa identificada pela primeira vez por Souza *et al.* (2011). A presença de *F. simplex* no médio rio Negro ao redor da cidade Santa Isabel do Rio Negro, por outro lado, é registrada pela primeira vez nesse estudo. Esse registro é curioso, uma vez que a espécie era considerada ausente de toda a bacia do rio Negro, com exceção da região de Manaus. Até o presente estudo, a espécie predominante no médio rio Negro era *F. obscurus*. Essa distribuição de *Fluviophylax simplex* no médio rio Negro indica a provável existência de uma conexão entre a cabeceira de tributários do rio Solimões e do rio Negro. O novo registro é surpreendente, pois muitas expedições já foram realizadas no rio Negro e essa espécie nunca foi coletada (Beltrão *et al.*, 2019), indicando uma possível distribuição disjunta para a espécie no rio Negro de cerca de 737 km entre Manaus e Santa Isabel do Rio Negro.

Esse tipo de distribuição está ocorrendo pelo que Dagosta e De Pinna (2019) definem como padrão Central da Amazônia de Águas Negras, em que os rios estão dentro de seus limites na posição aproximadamente central da Amazônia. Os autores salientam que existem inúmeros rios de águas pretas de distribuição irregular, com igarapés e rios de terra firme no interior da floresta, que fornecem oportunidades para os peixes restritos a essas condições, habitarem na porção do alto Amazonas, e assim manterem conexão entre as populações. Além disso,

episódios de distribuição juntando rios, como o Negro e o Madeira, já haviam sido recuperados por Dagosta e De Pinna (2017), uma vez que, embora o rio Madeira seja um rio de águas brancas, possui irrigação por afluentes de todos os tipos de águas. As espécies com esse padrão que também ocorrem no rio Madeira ou Tapajós, como é o caso de *F. simplex*, se restringem a porções inferiores dessas bacias, nos locais em que os afluentes de águas pretas são abundantes.

Pelos dados evidenciados na AMOVA, não há diferença genética significativa entre os grupos ao longo da distribuição geográfica da espécie ($F_{ct}=4,48\%$). No entanto, as populações dentro dos quatro grupos definidos (Solimões, Amazonas/baixo rio Negro, alto rio Negro e Purus) apresentam valores significativos que denotam uma população geneticamente estruturada ($F_{st}=0,78$). A existência de estrutura genética nas populações de *F. simplex* revela a possível subdivisão das populações em unidades locais intercruzantes. O resultado disso é a dinâmica do equilíbrio entre as forças evolutivas favoráveis à diferenciação, que são diferentes em cada área (seleção disruptiva, mutação e deriva genética) e forças uniformes nessas áreas que promovem homogeneização (seleção balanceadora, purificadora e migração) (Leão, 2009).

Analisadas aos pares fica nítido que as populações dos rios Tapajós e Solimões (Alvarães) são as que apresentam maior frequência quanto à diferenciação genética ($P<0,05$). Essas populações representam os extremos de distribuição da espécie e, apesar da diferenciação genética observada entre elas, é provável que o fluxo genético seja mantido ao longo do gradiente de distribuição. Cabe inferir, portanto, que, em termos de geografia, o isolamento por distância é o processo evolutivo mais importante.

A população de Uaicurapá (Parintins) apresentou dois haplótipos distintos, H1 e H2. O H1 possui relação próxima (apenas um passo mutacional) com o haplótipo de Manaus, no baixo rio Negro (H7). Por outro lado, o haplótipo H2 possui relação próxima com o haplótipo de Beruri, no rio Purus (H11). A presença de dois haplótipos distintos em Uaicurapá, ambos mais relacionados com outros haplótipos do que entre si, indicam uma grande capacidade de dispersão da espécie e que provavelmente esses padrões de conexão serão mais bem definidos no futuro com um número maior de espécimes sequenciados.

De acordo com Bragança e Costa (2018), a origem de *Fluviophylax simplex* ocorreu pelo aumento do fluxo de sedimentos na região Madeira-Purus promovendo a separação do ancestral comum à *F. simplex* e *F. pygmaeus*. Após esse período, uma diminuição no aporte de sedimentos teria possibilitado a dispersão de *F. simplex*. A respeito da ampla distribuição geográfica da espécie, ainda não está claro se as populações mantêm conexão pelos pulsos de

inundação, as várzeas, ou se esta ocorre pelo interior de florestas a partir dos pequenos tributários de água clara ou preta.

Ao abordar o aspecto ecológico dos peixes que habitam as águas ácidas e transparentes do médio rio Negro, Siqueira-Souza (2006) apresentou a importância da conexão desse rio com outras bacias hidrográficas, como o Solimões e o Orinoco, e que isso poderia ser promissor na distribuição de diferentes espécies na região. Além disso, salientou que os peixes ornamentais se desenvolvem, principalmente, nos igapós e igarapés de florestas, em áreas parcial ou completamente inundadas nos períodos de cheia dos rios (Beltrão *et al.*, 2019), locais que fornecem abrigo e servem de alimento em períodos mais críticos para a sobrevivência desses animais.

Para a ictiofauna, Loebens *et al.* (2016) destacam que interação com a floresta alagável é eficaz para a sua diversidade devido a integridade biótica presente nesse habitat, o que condiz diretamente com a manutenção da biodiversidade. A existência de peixes miniaturas em igarapés de floresta fornece subsídio para essa hipótese de conexão, a exemplo de duas novas espécies de *Poecilocharax* Eigenmann, 1909, *P. callipterus* e *P. rhizophilus* (Ohara *et al.*, 2022) registradas no município de Apuí, Amazonas, há aproximadamente 1000 km de Manaus. Esses registros foram pioneiros na margem direita da bacia do rio Amazonas, em afluentes que drenam escudos cristalinos em território brasileiro.

P. callipterus está localizada em um pequeno riacho de água preta do rio Juma, cujo fluxo é lento, de substrato rochoso, que atravessa um enclave de savana na floresta amazônica. Seus espécimes foram encontrados entre as gramíneas aquáticas e raízes próximas à margem. Já *P. rhizophilus* está tanto em riachos de águas pretas (rio Juma), quanto em águas claras (Igarapé Mutum), que atravessa uma área de pastagem com o solo lamacento e arenoso. Os espécimes também foram identificados em raízes subaquáticas da vegetação ciliar.

De acordo com Mattox *et al.* (2024), é comum acreditar que peixes em miniatura estejam mais associados a águas pretas, ácidas e com baixo teor de nutrientes, mas isso não é aplicável, por exemplo, a todas as espécies do gênero *Priocharax* Weitzman e Vari, 1987. Duas delas, *P. britzi* e *P. phasma*, ocorrem em planícies inundáveis de águas brancas e outras, como *P. marupiara* e *P. toledopizae*, possuem associação com cursos d'água límpidos presentes em bacias caracterizadas por águas brancas (Mattox *et al.*, 2021; 2024). Ainda assim, a associação aos rios de águas pretas não pode ser descartada para os representantes desse gênero, uma vez que *P. nanus* é conhecida nos arredores de Santa Isabel do Rio Negro, bem próximo ao Igarapé

Tapagem, rio Negro (Toledo-Piza *et al.*, 2014).

Ainda nesse viés, é importante frisar a amplitude de distribuição dessa gênero miniatura pela bacia Amazônica. Isso pode ser observado em *P. conwayi* na drenagem do rio Tapajós, em Santarém, com espécimes em área ribeirinha rasa na margem da floresta inundada de densa vegetação e riacho de fluxo lento. *Priocharax phasma*, citada anteriormente, está à montante da foz do rio Tapajós em lagos de várzea entre a vegetação marginal. Infelizmente, informações filogeográficas das espécies de *Priocharax* ainda são ausentes, mas poderiam esclarecer muito sobre a distribuição de peixes miniatura. É importante notar que as espécies de *Priocharax* são presentes em rios de águas pretas, claras e brancas, e ainda assim a distribuição é limitada, pois os rios funcionam como barreiras ao fluxo gênico. Porém, esse mesmo padrão amplo é identificado para *F. simplex*, o que reforça a necessidade de investigação em relação aos fatores históricos e ecológicos da espécie.

Vale ressaltar que até o momento é desconhecida a ocorrência de espécies de *Fluviphylax* ao longo da calha do rio Solimões/Amazonas, e a viabilidade da dinâmica de inundações de várzeas como facilitadora da comunicação entre populações ainda precisa ser investigada. Goulding *et al.* (1988), ao estudarem a ictiofauna do rio Negro, mencionam a presença de *Fluviphylax* associada a plantas flutuantes e propõem que esta talvez seja uma das formas dos indivíduos transporem grandes rios. Talvez, o transporte por plantas aquáticas possibilite a conexão entre populações de *Fluviphylax simplex* ao longo das calhas do Amazonas e Solimões, facilitando a transposição de cursos d'água com sedimentos. Uma outra alternativa que pode explicar a grande conectividade entre populações de *F. simplex*, deve-se à movimentação lateral de indivíduos por pequenos córregos e igarapés dentro da floresta, cujas cabeceiras podem se conectar durante a época de cheia dos rios.

Assim como as demais espécies do ecossistema amazônico, é de se esperar que os pequenos peixes também estejam adaptados à complexidade ambiental, seja pelo tamanho, variedade de formas, ou estratégias de vida (Soares *et al.*, 2008). Nesse ínterim, as florestas temporariamente inundadas, bem como as áreas de várzea, são cruciais na oferta de invertebrados terrestres e aquáticos, componentes da base da dieta de várias espécies de peixe (Junk, 1997), o que também é válido para *Fluviphylax simplex* (Leitão *et al.*, 2016).

Em concordância com os dados relativos à conectividade das populações de *Fluviphylax simplex*, as populações do rio Solimões, em Marã e Tefé, apresentam haplótipos também separados por apenas um passo mutacional (H5 e H12), o que é crucial para inferir sobre a

conectividade entre as populações. Por outro lado, por mais próxima que seja em termos geográficos, Alvarães não apresenta haplótipo proximalmente relacionado (H9) com os demais do rio Solimões. Esses são dados que concordam com os indicados na Análise da Variância Molecular. Ainda que não significativo ($P > 0,05$), o F_{st} pareado apresenta-se elevado para as populações de Alvarães e Tefé ($F_{st}=1,00$) e Alvarães e Maarã ($F_{st}=0,97$).

É provável que essa diferença genética entre populações aproximadas seja indicativo de barreiras ecológicas ao fluxo genético, e não geográficas, atuando sobre as populações de *F. simplex* no Médio Solimões. Por outro ângulo, as populações de Maraã (lago Amanã) e de Tefé podem estar em comunicação por meio de pequenos rios ou córregos no interior das florestas, que descem do lago Amanã até Tefé, o que seria menos provável para a região de Alvarés que fica mais ao norte, e o curso d'água não vá nessa direção. De qualquer forma, a hipótese sobre a manutenção de conexão entre elas não pode ser rejeitada, além disso seriam necessários mais estudos relativos à ecologia dessas espécies. Como inferido anteriormente, grande parte dessa comunicação pode estar associada às várzeas, uma das principais forças que direciona a diversidade da ictiofauna no ambiente associada a fatores de sazonalidade, por meio da dinâmica hidrológica e habitats disponíveis, além das cabeceiras de pequenos córregos nas florestas.

A partir do exposto, nota-se que a diversidade genética nas populações dessa espécie miniatura necessita de mais estudos que forneçam dados robustos sobre sua dispersão e história demográfica, bem como a definição dos limites de distribuição da espécie. Porém, é perceptível e aqui demonstrado que *F. simplex*, apesar de ser miniatura, é uma espécie amplamente distribuída.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, que disponibilizou o espaço e acesso aos materiais. Os autores agradecem à Cleonilde Queiroz (UEMASUL) pelo apoio e direcionamento na execução dos trabalhos em laboratório. Axel Katz (UFRJ), George Mattox (UFSCar), Claudio Oliveira (UNESP) e Camila Ribas (INPA) pelo envio exemplares disponíveis em suas coleções. Felipe Ottoni (UFMA) pela parceria, acompanhamento, disponibilidade de exemplares e financiamento dos *primers*. Este manuscrito contou com diversas contribuições de Pedro Bragança (Department of Ichthyology, American Museum of Natural History) Felipe Ottoni

(CICCAA-UFMA), Pedro Fasura de Amorim (LASEP-UFRJ) e Marcelo Andrade (Centro de Ciências Humanas, Naturais, Saúde e Tecnologia-UFMA).

REFERÊNCIAS

Avice JC. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*. 2009; 36 (1): 3-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x>

Batista JS. Caracterização genética da dourada – *Brachyplatystoma rousseauxii*-Castelnau, 1855 (Siluriformes, Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo. [Tese de Doutorado]. Manaus: Instituto de Pesquisas da Amazônia; 2010.

Beltrão H, Zuanon J, Ferreira E. Checklist of the ichthyofauna of the Rio Negro basin in Brazilian Amazon. *ZooKeys*. 2019; 881:53-89. <https://doi.org/10.3897/zookeys.881.32055>

Bragança PHN, Amorim PF, Costa WJEM. Pantanodontidae (Teleostei, Cyprinodontiformes), the sister group to all other cyprinodontoid killifishes as inferred by molecular data. *Zoosystematics and Evolution*. 2018; 94:137–145. <https://doi.org/10.3897/zse.94.22173>

Costa WJEM. Relationships, monophyly and three new species of the neotropical miniature poeciliid genus *Fluviphylax* (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidei). *Ichtyol. Explor. Freshwaters*. 1996; 7(2): 111-130.

Costa WJEM, Le Bail Y. *Fluviphylax palikur*: a new poeciliid from the Rio Oiapoque Basin, Northern Brazil (Cyprinodontiformes: Cyprinodontoidae), with comments on miniaturization in *Fluviphylax* and other neotropical freshwater fishes. *Copeia*. 1999; 4: 1027–1034. <https://doi.org/10.2307/1447977>

Dagosta FCP, De Pinna M. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. *Neotropical Ichthyology*. 2017; 15: e170034.

Dagosta FCP, De Pinna M. The fishes of the amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2019; 431: 163.

Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite v. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010; 10: 564-7. [10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x)

Excoffier L, Smouse, P, Quatro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992; 131: 479-491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>

Folmer O, Black M, Hoer W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994; 3: 294–9.

Fu YX. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997; 147: 915-925. doi: 10.1093/genetics/147.2.915.

Goulding M, Leal-Carvalho M, Ferreira E. Rio Negro, rich life in poor water: Amazonian diversity and foodchain ecology as seen through fish communities. The Netherlands: SPB Academic Publishing, 1998.

Hall TA. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41: 95-98.

Harpending RC. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*. 1994; 66: 591-600.

Hercos AP, Queiroz HL, Gomes GFE, Ferreira EJJ. Homogeneidade genética de *S. tarzoo* (perciformes: cichlidae) no lago Amanã, Amazonas, Brasil. *RBCA*. 2017; 6 (1):1-62. <https://doi.org/10.47209/2317-5729>.

Junk WJ. *The Central Amazon Floodplain: Ecology of a Pulsing System*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 1997.

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

Leitão RP. *et al.* Rare species contribute disproportionately to the functional structure of species assemblages. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2016; 283 (1828): 20160084-93. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0084>.

Loebens SC. *et al.* Diversidade de assembleias de peixes em floresta alagada de águas pretas da Amazônia Central. *Sientia Amazonica*. 2016; 5 (1): 37-44.

Mattox GMT. *et al.* A new miniature species of *Priocharax* (Teleostei: Characiformes: Characidae) from the Rio Madeira drainage, Brazil, with comments on the adipose fin in characiforms. *Vertebrate Zoology*. 2020; 70 (3): 417-33. <https://doi.org/10.26049/VZ70-3-2020-11>

Mattox GMT. *et al.* Two new miniature species of the fish genus *Priocharax* from the Rio Tapajós and Amazonas drainages, Pará, Brazil (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Vertebrate Zoology*. 2024; 74: 533-50. <https://doi.org/10.3897/vz.74.e130038>

Melo ER. *et al.* Caracterização genética de estoques de tambaqui de duas estações de piscicultura no baixo rio São Francisco. *Semina: Ciências Agrárias*. 2020; 41 (6): 3323–34. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/39585>.

Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 1987.

Ohara WM, Pastana M, Camelier P. The monophyly of Crenuchinae and description of two new species of *Poecilocharax* (Teleostei: Crenuchidae) based on phenotypic and genotypic

evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2022; 1-32.

Perkin JS. *et al.* Estimated richness and environmental correlates of miniaturefish assemblages in the rio Jacundá, Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 2022; 20 (2):1–16. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2021-0051>

Ratnasingham S, Hebert PD. A DNA-based registry for all animal species: the barcode index number (BIN) system. *PLoS One*. 2013; 8 (7): e66213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213>

Ronquist F. *et al.* MrBayes 3.2:Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space.*Systematic Biology*. 2012; 61 (3) :539–542.

Rozas J. *et al.* DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2017; 34: 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

Sigma. Extract-N-Amp™Tissue PCR Kit Protocol. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/protocol/genomics/dna-an-purification/extract-n-amp-tissue-pcr-kit#procedure>.

Silva JMC, Garda AA. Padrões e processos biogeográficos na Amazônia. *In: Carvalho CBJ, Almeida E. Biogeografia da América do Sul: padrões e processos*. 1. ed. São Paulo: Roca; 2011. p. 189-197.

Siqueira-Souza FK. *et al.* Peixes do Médio Rio Negro: uma abordagem ecológica. - . Manaus: EDUA; 2006. p. 45.

Soares GM. *et al.* Peixes de lagos do Médio Rio Solmões. 2.ed. Manaus: Instituto I-PIATAM; 2008. p. 160.

Souza ER, Ribeiro LB, Feldberg E, Farias IP, Hrbek T, Gross MC. Comparative cytogenetics of two of the smallest Amazonian fishes: *Fluviphylax simplex* Costa, 1996 and *Fluviphylax zonatus* Costa, 1996 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Comparative Cytogenetic*. 2011; 5 (5): 411–422. <https://doi.org/10.3897/compcytogen.v5i5.1562>

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989; 123: 585-595. doi: 10.1093/genetics/123.3.585.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22 (22): 4673-4680. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.

Toledo-Piza M, Mattox GMT, Britz R. *Priocharax nanus*, a new miniature characid from the rio Negro, Amazon basin (Ostariophysi: Characiformes), with an updated list of miniature Neotropical freshwater Fishes. *Neotropical Ichthyology*. 2014; 12 (2): 229-246. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20130171>

Weitzman SH, Vari RP. Miniaturization in South America freshwater fishes:an overview and discussion. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 1988; 101 (2): 444–465. <https://repository.si.edu/handle/10088/901>

Wright S. *Evolution in mendelian populations*. University of Chicago, Chicago, Illinois; 1931.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho ficou constatado que as populações de *Fluviiphylax simplex* apresentam elevada diversidade genética e estão localizadas em rios de águas com características químicas distintas. Sua amplitude de distribuição é semelhante a padrões encontrados para outros peixes de água doce da região amazônica, porém para uma espécie miniatura, essa distribuição é surpreendente. É provável que a conectividade entre essas populações ocorra por meio das várzeas, ou mesmo por conexões entre as cabeceiras de pequenos córregos e igarapés no interior das florestas.