

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

## **TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDOS DE SISTEMÁTICA MOLECULAR E DE  
BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA DO BAGRE DE ÁGUA DOCE  
*Pseudoplatystoma* Bleeker, 1862 (PIMELODIDAE) NA AMÉRICA DO  
SUL.**

**LUIS FERNANDO CARVALHO COSTA**

SÃO CARLOS-SP

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**ESTUDOS DE SISTEMÁTICA MOLECULAR E DE  
BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA DO BAGRE DE ÁGUA DOCE  
*Pseudoplatystoma* Bleeker, 1862 (PIMELODIDAE) NA AMÉRICA DO  
SUL.**

Doutorando: Luis Fernando Carvalho Costa  
Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.  
Co-orientador: Prof. Dr. Guillermo Ortí (Universidade George Washington-EUA)

Tese de Doutorado como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais) pelo programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar.

SÃO CARLOS-SP

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C837es

Costa, Luis Fernando Carvalho.

Estudos de sistemática molecular e de biogeografia histórica do bagre de água doce *Pseudoplatystoma* Bleeker, 1862 (Pimelodidae) na América do Sul / Luis Fernando Carvalho Costa. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
149 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Genética animal. 2. Filogenia. 3. Biogeografia. 4. Sistemática. 5. Peixes. I. Título.

CDD: 591.15 (20ª)

**Luis Fernando Carvalho Costa**

**ESTUDOS DE SISTEMÁTICA MOLECULAR E DE BIOGEOGRAFIA  
HISTÓRICA DO BAGRE DE ÁGUA DOCE *Pseudoplatystoma* Bleeker, 1862  
(PIMELODIDAE), NA AMÉRICA DO SUL**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Aprovada** em 26 de março de 2010

**BANCA EXAMINADORA**

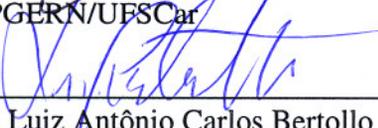
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior  
(Orientador)

1º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Eduardo dos Santos  
PPGERN/UFSCar

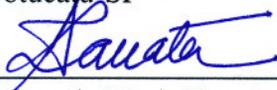
2º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo  
PPGGEV/UFSCar

3º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cesar Martins  
UNESP/Botucatu-SP

4º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Angela Maria Zanata  
UFBA/Salvador-BA

*Dedico esta tese à minha família.*

*"Eu gostaria de ser lembrado como um sujeito que amou profundamente o mundo e as pessoas, os bichos, as árvores, as águas, a vida".*

*Paulo Freire*

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela oportunidade de formação acadêmica de alto nível;

Ao CNPq e FAPESP pela concessão das bolsas que me permitiram dedicação integral ao doutorado;

Ao Banco da Amazônia pelo financiamento de parte do projeto;

À CAPES pela bolsa de PDEE que permitiu expandir meus horizontes, mesmo na curta permanência nos EUA;

Ao Professor Dr. Pedro Manoel Galetti Jr. pela inestimável confiança, competência e pelo profissionalismo que um dia espero ter;

Ao Professor Dr. Guillermo Ortí pela confiança, competência e amizade;

Aos colaboradores (as) que gentilmente cederam amostras para este estudo: Evoy Zaniboni Filho, María Doris E. Lizarazo, Maurício Carrilo Ávila, Nathan Lovejoy, Izeni P. Farias, Wellington M. Pérez, FURNAS, Alexandre Benvindo, Marc H. Sabaj Pérez, Stuart C Willis, Nivaldo Piorski, Guillermo Ortí e Emiko Kawakami de Resende.

Agradeço a Ana Cristina Fazza pela ajuda na obtenção das sequências dos peixes das Guianas;

Agradeço ao IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente) pela licença de coleta e transporte de material;

Aos amigos e amigas do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética, do Departamento de Genética e Evolução e do PPGERN: Alexandra (Lelê), Aline, Alline, Allysson, Ana Cristina, Ana Karina, Artur, Beatriz (Bia), Beto (cito), Bruno, Camila, Carla, Carol Dal Ri, Celeste, Cervini, Daniel (Gaúcho), Daniel (cito) Débora, Elisângela, Eloise, Felipe, Fernanda, Fernando (Testa), Fernando, Hélio, Júlia, Juliano (ratinho), Iderval, Lívia, Margarita, Marina (Caticoca), Marina, Maurício, Michele, Milene, Nivaldo, Niara, Patrícia, Paulo, Perla, Renatinha, Rosângela, Savana, Sara, Terumi, Thaís, Thiago (Ervilha), Wellington, e outros. Obrigado pela paciência e companheirismo;

Aos amigos e amigas dos Estados Unidos (Stuart, Julie, Cal, Chenhong, Holy e Jeremy) e funcionários (as) do School of Biological Sciences (Universidade do Nebraska-Lincoln) por todo o apoio e consideração durante minha estada naquele país;

Aos amigos e amigas da UFMA (Universidade Federal do Maranhão) pela amizade;

Aos meus pais: José Raimundo e Marlene; meus irmãos e irmãs: Luís, Márcio, Rita e Fernanda; meus sobrinhos e sobrinhas: Felipe, João, Gabriel, Júlia e Rachel; Aos meus avós (*in memoriam*);

À Maelin...

A todos (as) que eu esqueci, sintam-se lembrados (as) em meu coração.

## RESUMO

Os bagres do gênero *Pseudoplatystoma* são pimelodídeos carnívoros, migradores e de importância pesqueira em todas as grandes bacias hidrográficas da América do Sul. Apenas três espécies eram reconhecidas para o gênero (*P. corruscans*, *P. fasciatum* e *P. tigrinum*), mas uma nova revisão elevou para oito o número de espécies (*P. fasciatum*, *P. punctifer*, *P. orinocoense*, *P. magdaleniatum*, *P. reticulatum*, *P. tigrinum*, *P. metaense* e *P. corruscans*). Recentemente, *Pseudoplatystoma* foi alvo de um estudo de filogenia molecular com marcadores mitocondriais, onde foram encontrados clados monofiléticos para *P. tigrinum*, *P. corruscans*, *P. reticulatum*+*P. punctifer*+*P. fasciatum* e *P. magdaleniatum*. Apesar desses avanços no conhecimento da história evolutiva e da sistemática do grupo, ainda restam questões a serem respondidas. Dessa forma, o presente estudo objetivou uma análise filogenética molecular em *Pseudoplatystoma* para tentar responder questões pendentes sobre a sistemática e taxonomia do grupo, bem como propor um cenário para sua história de diversificação no espaço geográfico da América do Sul. Para isso, foram empregados o gene mitocondrial do Citocromo b e íntrons dos genes Rag1 e S7, cujas filogenias foram estimadas por Máxima Verossimilhança no programa TREEFINDER. Os nós das filogenias foram datados no programa BEAST. Foi demonstrado que algumas espécies de *Pseudoplatystoma*, resultantes da última revisão do gênero, não correspondem a grupos monofiléticos ou não tiveram clados significativamente sustentados em todas as árvores. As únicas espécies monofiléticas em todos os marcadores foram *P. magdaleniatum* e *P. corruscans*. *Pseudoplatystoma orinocoense* só foi uma linhagem monofilética no Citocromo b. À luz desses resultados, sugere-se que a antiga terminologia *P. fasciatum* seja revalidada para os táxons do clado aqui definido como clado *P. fasciatum*: *P. punctifer* (Amazonas, Maranhão, Tocantins-Araguaia), *P. reticulatum* (Paraná-Paraguai) e *P. fasciatum* (Guianas). Sob a mesma racionalidade, *P. tigrinum* deveria ser revalidado para o Orinoco, dado o parafilético de *P. metaense*. Entretanto, alguns dos casos de espécies não-monofiléticas em um ou mais marcadores podem ser devidos à separação incompleta de linhagens, embora essa possibilidade necessite ser investigada com o uso de outros marcadores. A história da diversificação de *Pseudoplatystoma* foi resultado de milhões de anos de evolução e fortemente influenciada pela evolução da matriz geográfica Sul-Americana. O estudo biogeográfico nos permitiu identificar e datar os eventos de diversificação importantes para o gênero e relacioná-los às mudanças geomorfológicas e/ou climáticas históricas conhecidas para a América do Sul, que seriam as causas primárias de diversificação de outros peixes de água doce do continente.

Palavras-Chave: Neotropical, Filogenia, bagres, mtDNA, nDNA, íntrons, biogeografia, sistemática molecular.

## ABSTRACT

The catfishes of the *Pseudoplatystoma* genus are carnivore pimelodids, migratory and important for fisheries in all major river basins from South America. Only three species were recognized for the genus (*P. corruscans*, *P. fasciatum* and *P. tigrinum*), but a new revision raised to eight the number of species (*P. fasciatum*, *P. punctifer*, *P. orinocoense*, *P. magdaleniatum*, *P. reticulatum*, *P. tigrinum*, *P. metaense* and *P. corruscans*). Recently, *Pseudoplatystoma* was the subject of a molecular phylogeny study based on mitochondrial markers, where monophyletic clades were found for *P. tigrinum*, *P. corruscans*, *P. reticulatum*+*P. punctifer*+*P. fasciatum* and *P. magdaleniatum*. Despite these advances on the knowledge of the evolutionary history and systematics of the group, there are still questions to be answered. Thus, this study aimed a molecular phylogenetic analysis on *Pseudoplatystoma* to try to answer pendant questions about the systematics and taxonomy of the group, and propose a scenario for its diversification history in the geographic area of South America. In order to do this, we employed the mitochondrial Cytochrome b gene and introns from Rag1 and S7 genes, whose phylogenies were estimated by Maximum Likelihood using TREEFINDER software. Nodes were dated on BEAST software. It was shown that some *Pseudoplatystoma* species, resulting from the last revision of the genus, do not correspond to monophyletic groups or they were not significantly supported clades in all trees. The only monophyletic species in all markers were *P. magdaleniatum* and *P. corruscans*. *Pseudoplatystoma orinocoense* was a monophyletic lineage only on Cytochrome b. In light of these results, it is suggested that the old terminology *P. fasciatum* to be revalidated for the taxa here defined as *P. fasciatum* clade: *P. punctifer* (Amazon, Maranhão, Tocantins-Araguaia), *P. reticulatum* (Paraná-Paraguay) and *P. fasciatum* (Guyanas). Under the same rationale, *P. tigrinum* should be revalidated for Orinoco, given the paraphyletism of *P. metaense*. However, some cases of non-monophyletic species in one or more markers may be due to incomplete lineage sorting, although this possibility needs to be investigated using other markers. The history of diversification of *Pseudoplatystoma* was the result of millions of years of evolution and it was strongly influenced by the evolution of the South America geographical matrix. The biogeographic study allowed us to identify and date the important diversification events for the genus and relate them to the historical geomorphological and/or climate changes reported for South America, which would be the primary diversification causes for other freshwater fishes from the continent.

Key-Words: Neotropical, Phylogeny, catfish, mtDNA, nDNA, introns, biogeography, molecular systematics.

## SUMÁRIO

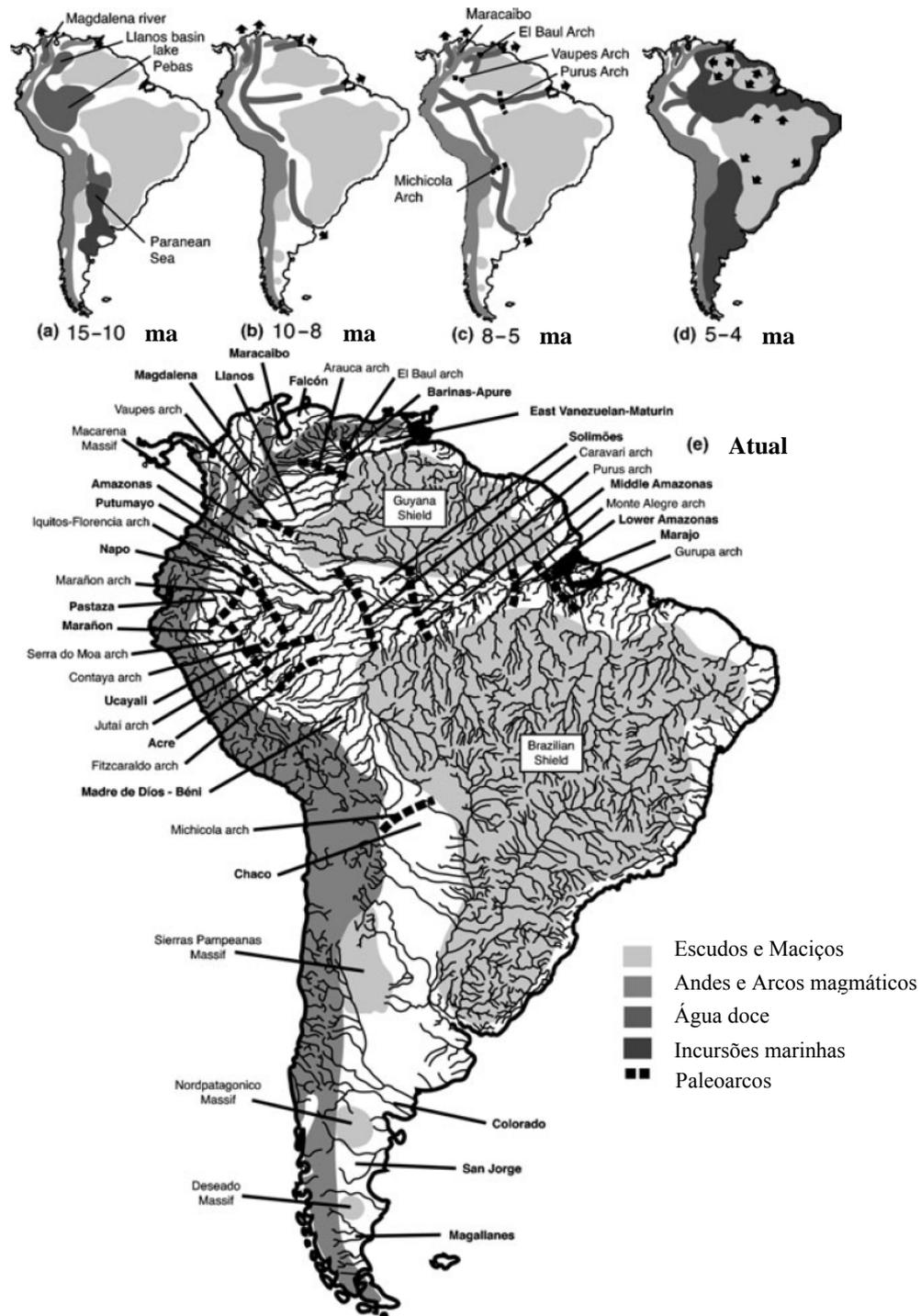
<b>RESUMO</b> .....	07
<b>ABSTRACT</b> .....	08
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	09
1.1. História da formação das grandes bacias hidrográficas da América do Sul.....	09
1.2. Biogeografia Histórica de peixes de água doce da América do Sul.....	14
1.3. O uso de filogenias moleculares em estudos biogeográficos .....	20
1.4. A situação sistemática e taxonômica do gênero <i>Pseudoplatystoma</i> .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1. Locais de amostragem e extração de DNA .....	36
3.2. Amplificação enzimática dos marcadores de DNA mitocondrial e nuclear.....	41
3.3. Análises filogenéticas.....	43
3.4. Estimativa dos tempos de divergência dos clados .....	47
<b>4. RESULTADOS</b> .....	51
4.1. Sistemática Molecular de <i>Pseudoplatystoma</i> .....	51
4.2. Datação dos eventos de cladogênese.....	68
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	74
5.1. Quantas espécies há em <i>Pseudoplatystoma</i> ?.....	74
5.2. Como a vicariância e a dispersão influenciaram a diversificação de <i>Pseudoplatystoma</i> ?.....	82
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	95
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	96

## 1-INTRODUÇÃO

### 1.1-História da formação das grandes bacias hidrográficas da América do Sul

Segundo Lundberg *et al.* (1998), nos últimos 90 milhões de anos (**ma**), a América do Sul passou por três desenvolvimentos principais: 1) o aumento do isolamento em relação à África com a contínua abertura do Oceano Atlântico, 2) a história complexa do soerguimento das montanhas andinas ao longo de sua margem oeste e norte, 3) a formação de sua ligação ístmica à América Central que separou os oceanos Atlântico e Pacífico. Na maior parte do Oligoceno (36-23 **ma**), houve um período de calma tectônica na América do Sul (Malvicini & Llambías, 1982), interrompido pela modificação na direção convergente das placas tectônicas de Nazca e Sul-Americana, que induziu importantes modificações no arco Andino, ocasionando a reativação do cinturão magmático principal e a atividade ígnea no início do Mioceno (23-5 **ma**) (Uliana & Biddle, 1988). Foi apenas no médio Mioceno (16 **ma**) que a paisagem Sul-Americana começou a ser dominada pelos processos responsáveis pela sua atual configuração (Uliana & Biddle, 1988).

Os últimos 12 milhões de anos de ativo tectonismo no norte dos Andes resultaram em mudanças geomorfológicas importantes na região, como o isolamento das modernas drenagens do Noroeste da América do Sul (Albert & Crampton, 2005). Nesse sentido, a formação das grandes bacias hidrográficas Neotropicais modernas foi influenciada pela dinâmica de formação dos Andes, e também de paleoarcos, que desencadearam inúmeros eventos vicariantes e de captura de cabeceiras entre bacias nos últimos 8-10 **ma** (Figura 1) (Räsänen *et al.*, 1987, 1990, 1992; Hoorn *et al.*, 1995; Irion *et al.*, 1995; Lundberg *et al.*, 1998).



**Figura 1:** Evolução das drenagens Sul-Americanas nos últimos 15 milhões de anos, segundo Hubert & Renno (2006). (a) Incursões marinhas e lagos continentais entre 15 e 10 **ma**; (b) Regressões marinhas e rios entre 10 e 8 **ma**; (c) Estabelecimento final dos rios Amazonas, Paraguai e Orinoco entre 8 e 5 **ma**. (d) Incursões marinhas entre 5 e 4,2 **ma**; (e) Geomorfologia e sistemas hidrográficos Sul-Americanos modernos.

A elevação da Cordilheira Oriental dos Andes (12 **ma**) e dos Andes de Mérida (8 **ma**) teriam sido os responsáveis por definir as fronteiras atuais dos sistemas hidrográficos do Noroeste da América do Sul, a saber: Amazonas Ocidental, Orinoco, Maracaibo, Magdalena e as drenagens do Pacífico (Hoorn *et al.*, 1995; Diaz de Gamero, 1996; Hoorn, 1996; Gregory-Wodzicki, 2000). Fósseis de diversos grupos de peixes indicam uma antiga fauna representante da paleobacia Amazonas-Orinoco, com alguns deles extintos atualmente (Lundberg, 1997, 1998; Lundberg & Aguilera, 2003). Até 12 milhões de anos atrás, quando não existia a Cordilheira dos Andes Oriental, a região central da Colômbia, onde hoje está situada a bacia do Rio Magdalena, também fazia parte desse paleo-sistema (Hoorn, *et al.*, 1995, Lundberg *et al.*, 1998). Entretanto, o soerguimento dos Andes Orientais resultou no isolamento desta drenagem, ocasionou a mudança na direção do seu fluxo para oeste e a extinção de grande parte de sua fauna compartilhada com o Amazonas-Orinoco (Hoorn *et al.*, 1995; Lundberg *et al.*, 1998). A elevação final do Noroeste dos Andes também levou à formação da bacia do Lago de Maracaibo (Venezuela), isolando-a do Paleo Amazonas-Orinoco há oito milhões de anos (Hoorn, 1993; Hoorn *et al.*, 1995).

Nem sempre o Amazonas teve a configuração de drenagem no sentido oeste-leste que apresenta hoje. O Amazonas atingiu seu curso atual apenas há, aproximadamente, oito milhões de anos (Dobson *et al.*, 2001; Harris & Mix, 2002). Até então, havia um sistema amazônico com fluxo invertido ao atual, cujas cabeceiras estavam perto do atual Rio Xingú, que tinha sua vazão para o Atlântico, na época, barrada pelo *rift* de Marajó (Hoorn *et al.*, 1995; Lundberg *et al.*, 1998). Neste período, os Andes eram montanhas baixas e descontínuas (Wesselingh & Salo, 2006). A água doce do Alto-Médio Amazonas+Orinoco estava confinada em um grande paleolago, chamado Pebas (15-10 **ma**) (Hoorn, 1994; Potter, 1994; Hoorn *et al.*, 1995; Hoorn,

1996; Marshall & Lundberg, 1996; Lundberg *et al.*, 1998; Wesselingh *et al.*, 2002; Wesselingh, 2006) (Figura 1). Pebas era um sistema de lagos e alagados com influências fluvial e marinha, que cobriu grandes áreas da Amazônia Ocidental durante o médio Mioceno (Wesselingh & Salo, 2006). O Arco de Purus, formado no fim da elevação dos Andes, separava o Lago Pebas da Amazônia Oriental (Baixo Amazonas), forçando a maior parte da Amazônia Ocidental a drenar em direção ao Mar do Caribe (norte da América do Sul), num delta localizado na atual bacia do Maracaibo, na Venezuela (Mullins *et al.*, 1987; Hoorn, 1994, 1996; Piper *et al.*, 1997; Lundberg, 1998; Vonhof *et al.*, 1998; Cordani *et al.*, 2000; Gregory-Wodzicki, 2000; Colinvaux & De Oliveira, 2001; Vonhof *et al.*, 2003).

Enquanto os rios do Alto e Médio Amazonas drenavam para o Lago Pebas, os rios das Guianas e do escudo brasileiro drenavam para o Oceano Atlântico através do atual Baixo Amazonas (Hoorn *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2001). Os registros indicam, ainda, que o Lago Pebas estava, intermitentemente, conectado à bacia do Paraná-Paraguai (Albert *et al.*, 2006). Contudo, a elevação dos Andes Venezuelanos e do Arco de Valpes atuaram separando as bacias do Amazonas e Orinoco (entre 8 e 5 **ma**), bloqueando o fluxo do Lago Pebas para o Mar do Caribe, o que ocasionou o rompimento do Arco de Purus e a mudança na direção da bacia Amazônica para o seu curso atual ao leste (Hoorn, 1993; Hoorn *et al.*, 1995; Lundberg *et al.*, 1998; Gregory-Wodzicki, 2000), formando a maior bacia de água doce em extensão e com a maior descarga fluvial do mundo (Goulding *et al.*, 2003) (Figura 1). A idade deste evento ainda é muito debatida, uma vez que alguns autores defendem que ele tenha ocorrido mais recentemente, entre 1,8 e 3 milhões de anos (Cordani *et al.*, 2000; Vega, 2007). O sistema Paraná-Paraguai separou-se do Proto-Amazonas há 10 **ma**, embora haja

evidências da ocorrência de captura de cabeceiras entre essas drenagens neste intervalo de tempo (Räsänen *et al.*, 1995; Lundberg *et al.*, 1998) (Figura 1).

Apesar da importância evidente de eventos paleogeográficos na evolução das bacias de drenagem da América do Sul, há que se considerar, também, o impacto que oscilações climáticas ocorridas durante o Plio-Pleistoceno (5-0,1 **ma**) tiveram na configuração histórica desses sistemas hidrográficos. As mudanças climáticas dessa época foram causadas pelo ciclo de Milankovitch, alterações periódicas na órbita da Terra que afetaram a quantidade de radiação solar incidente sobre a atmosfera e responsáveis pelo ciclo glacial-interglacial (Mueler & MacDonald, 1995; Rutheford & D'Hondt, 2000). Segundo Lomolino *et al.* (2006), no início do Mioceno, o clima global começou a esfriar e ficar mais seco gradualmente, com declínios de 4 a 8°C na temperatura do ar (5,4 a 6°C na América do Sul). Grandes glaciares foram formados, que reduziram bastante o fluxo de massa de ar polar nessas regiões e levaram a uma mudança nas zonas térmicas do planeta. Novas combinações de temperatura, ventos, correntes marinhas e precipitação criaram zonas climáticas e edáficas não existentes atualmente, mas que afetaram fortemente os climas regionais (Jackson, 2004). A amplitude total das mudanças no nível do mar, associadas a essas condições, pode ter excedido 230 metros durante o Pleistoceno, com uma redução de até 100 m no início do Holoceno (100 mil anos atrás), que deve ter exposto uma área considerável da plataforma continental permitindo ligações terrestres entre diferentes regiões biogeográficas (ex. Estreito de Bering ligando Ásia e América do Norte) (Lomolino *et al.*, 2006). Uma das muitas incursões marinhas no Baixo Amazonas, associada a mudanças globais no nível do mar ocorridas há cinco milhões de anos, durou aproximadamente 800 mil anos e eliminou todos os habitats dulcícolas dessa região (Haq *et al.*, 1987; Nores, 1999, 2004). Este tipo de evento proporcionou a invasão de

águas continentais por espécies marinhas de raias (Myliobatiformes), peixe-agulha (Beloniformes), entre 23 e 15 **ma**, quando ocorreu uma grande transgressão marinha (Lovejoy *et al.*, 1998; Lovejoy & Araújo, 2000; Marques, 2000; Lovejoy *et al.*, 2006).

Em suma, o isolamento e a conexão entre drenagens, promovidos por fatores geológicos e flutuações no nível do mar, podem ter fornecido oportunidades para diferenciação alopátrica e dispersão entre os sistemas hidrográficos Sul-Americanos, o que ajuda a explicar, em parte, a imensa diversidade de peixes da região.

## **1.2-Biogeografia Histórica de peixes de água doce da América do Sul**

Segundo Lomolino *et al.* (2006), a Biogeografia Histórica estuda a história da distribuição de táxons e biotas, onde a especiação, a extinção e a dispersão são os mecanismos pelos quais os organismos podem “responder” à dinâmica espacial e temporal da matriz geográfica. Nesses estudos, tem se percebido que ambas a dispersão e a vicariância têm desempenhado papéis importantes na explicação da distribuição dos táxons (Stace, 1989). Dessa forma, um dos métodos mais importantes no estudo da Biogeografia Histórica é o Método de Vicariância, fundamentado na simples racionalidade de que as explicações históricas para distribuições descontínuas de organismos relacionados se enquadram em duas categorias. De acordo com a hipótese da dispersão, os organismos tiveram que migrar sobre barreiras geográficas pré-existentes para atingir sua área de ocorrência atual, ao passo que, segundo a hipótese da vicariância, a formação de novas barreiras foi que fragmentou a distribuição geográfica, previamente contínua, de um táxon (Platnick & Nelson, 1978; Nelson & Platnick, 1981; Wiley, 1981, 1988). A hipótese vicariante será apoiada se múltiplos táxons exibem padrões similares de endemismo, podendo ser falseada se for incompatível com dados

sobre a história geológica e climática, com o registro fóssil ou se as filogenias de dois ou mais táxons co-distribuídos geram diferentes cladogramas de área (história da ramificação do espaço geográfico) (Lomolino *et al.*, 2006). Ao contrário da vicariância, que exerce efeitos na distribuição geográfica dos organismos de forma semelhante, a dispersão é mais idiossincrática, na medida em que depende da oportunidade histórica para migração e da capacidade dos organismos para realizarem esta tarefa. Dessa forma, a dispersão não tende a produzir congruência biogeográfica entre táxons, embora, isto possa ocorrer se a oportunidade à dispersão for proporcionada a muitos táxons ao mesmo tempo (Lieberman, 2004).

Um dos subprodutos do processo evolutivo, abordado dentro da Biogeografia, é a especiação, um processo de ramificação ou cladogênese onde novas espécies se originam a partir de uma espécie ancestral. Estudos sobre especiação tentam responder sobre a necessidade do isolamento geográfico e a importância relativa dos processos evolutivos de cunho determinístico (seleção natural) e aleatórios (deriva genética) para o processo (Coyne & Orr, 2004). Historicamente, o isolamento geográfico tem sido considerado o mais frequente, senão necessário, primeiro passo no processo de especiação, no que ficou conhecido como especiação alopátrica (Mayr, 1942). O surgimento de uma barreira geográfica à dispersão, em algum lugar dentro da distribuição de uma espécie ancestral, isola (vicariância) populações previamente intercruzantes, interrompendo ou diminuindo o fluxo gênico entre elas (Lomolino *et al.*, 2006). Eventos tectônicos, variações no nível do mar, etc, são exemplos de eventos vicariantes que podem isolar grandes conjuntos de populações co-distribuídas, mas a especiação alopátrica também pode ocorrer a partir de isolados periféricos, onde indivíduos podem dispersar sobre uma barreira geográfica para colonizar uma região não habitada previamente por eles (Evento de Fundador) (Lomolino *et al.*, 2006).

Evidências para a especiação alopátrica vicariante, segundo Coyne & Orr (2004), incluem: a concordância geográfica de limites de espécies com barreiras geográficas ou climáticas existentes; coincidências geográficas de limites de diferentes espécies ou de zonas híbridas entre diferentes táxons; espécies irmãs recentemente divididas encontradas em alopatria; ausência de espécies irmãs em áreas onde o isolamento geográfico fosse improvável; concordâncias entre barreiras geográficas atuais ou pretéritas e descontinuidades genéticas entre espécies; o aumento do isolamento reprodutivo entre populações com a distância geográfica, etc.

Um corolário biogeográfico importante é que espécies-irmãs que resultem de processos vicariantes tendem a estar distribuídas alopatricamente (Lomolino *et al.*, 2006). Entretanto, se o processo de diversificação envolve, principalmente, atributos ecológicos, estas tenderão a apresentar ecologias divergentes, podendo até ser encontradas em simpatria (Barracough & Vogler, 2000). Da mesma forma, espécies que sejam extremamente similares em seus nichos ecológicos tenderão a ter distribuições geográficas disjuntas (Lomolino *et al.*, 2006). Perdices *et al.* (2002) e Reeves & Bermingham (2006) apresentam evidências de que atributos ecológicos diferentes entre linhagens genealógicas de peixes podem ter desempenhado papéis importantes na delimitação dos limites entre elas nas bacias de drenagem da América Central. Houve oportunidades para dispersão, via captura de cabeceiras e anastomose entre rios, no entanto linhagens evolutivamente próximas, mas com ampla sobreposição de nicho, raramente são encontradas em simpatria.

Por causa de sua inabilidade fisiológica em dispersar pela terra ou mar, a distribuição de organismos de água doce reflete mais fielmente a história biogeográfica do que a de outros organismos (Lomolino *et al.*, 2006). Os peixes podem chegar a novas bacias mediante eventos de captura de rios (em geral pelas cabeceiras), confluência de

rios (pelos seus cursos inferiores) após um evento de regressão marinha, ou ainda pela dispersão via oceano quando baixas condições de salinidade são estabelecidas (Bishop, 1995). Neste sentido, os peixes de água doce oferecem uma oportunidade única para testes de hipóteses biogeográficas, porque sua dispersão depende de conexões entre as bacias de drenagens. Assim, espera-se que linhagens evolutivamente próximas habitem a mesma bacia hidrográfica, ou seja, elas devem apresentar um ancestral comum mais recente com peixes da mesma bacia do que com peixes de outras bacias (Willis *et al.*, 2007). Embora a maior parte dos estudos com peixes Neotropicais corroborem essa hipótese, há exemplos de populações de drenagens diferentes que apresentam relações evolutivas mais próximas entre si do que com outras populações da mesma bacia (Weitzman & Weitzman, 1982; Vari, 1984, 1989a,b, 1991, 1992, 1995; Schaefer, 1997; Hrbek & Larson, 1999; Lovejoy & Araújo, 2000; Sivasundar *et al.*, 2001; Montoya-Burgos, 2003; Castro & Vari, 2004; Turner *et al.*, 2004).

As espécies de peixes de água doce da região Neotropical constituem a mais rica ictiofauna continental do mundo (Böhlke *et al.*, 1978; Schaefer, 1998; Lundberg *et al.*, 2000). A maior parte dessas famílias teve origem no Cretáceo (145-65 **ma**; Albert *et al.*, 2006), mas estima-se, por meio de filogenias moleculares e pelo registro paleontológico, que, pelo menos, 25 gêneros contemporâneos já estavam presentes no Noroeste da América do Sul no fim do Mioceno (Zamudio & Green, 1997; Bermingham & Martin, 1998; Montoya-Burgos *et al.*, 1998; Martin & Bermingham, 2000; Sivasundar *et al.*, 2001; Perdices *et al.*, 2002; Albert *et al.*, 2006). O registro fóssil demonstra, ainda, que a fauna de Characiformes já era similar à atual há 10 milhões de anos (Gayet & Meunier, 1998; Lundberg *et al.*, 1998; Malabarba, 1998). Fósseis do Mioceno (13 **ma**) de bagres modernos da família Pimelodidae foram encontrados próximos à bacia do Rio Magdalena (Guerrero, 1997; Lundberg &

Aguilera, 2003; Lundberg, 2005). O registro fóssil de outros táxons modernos também indica idades similares de origem e diversificação para os peixes Neotropicais (Arratia & Cione, 1996; Lundberg, 1998; Gayet & Meunier, 2003).

A alta diversidade da ictiofauna dulcícola Neotropical tem sido moldada pelos vários eventos geomorfológicos e demográficos ocorridos ao longo dos últimos 90-115 milhões de anos (Lundberg *et al.*, 1998), dos quais destacam-se eventos vicariantes e de coalescência entre sistemas de drenagens (Weitzman & Weitzman, 1982; Bermingham & Avise, 1986; Vari, 1988, 1989a,b; Vari & Weitzman, 1990; Schaefer, 1997; Strange & Burr, 1997; Bermingham & Martin, 1998; Dergam *et al.*, 1998; Lundberg *et al.*, 1998; Hrbek & Larson, 1999; García *et al.*, 2000; Lovejoy & Araújo, 2000; Andrade *et al.*, 2001; Lovejoy & Collette, 2001; Sivasundar *et al.*, 2001; Dergam *et al.*, 2002; Perdices *et al.*, 2002; Montoya-Burgos, 2003; Moyer *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2004; Hrbek *et al.*, 2005a,b; Moyer *et al.*, 2005; Albert *et al.*, 2006; Říčan & Kullander, 2006; Reeves & Bermingham, 2006; Renno *et al.*, 2006; Hubert & Renno, 2006; Hubert *et al.*, 2007; Willis *et al.*, 2007; Chiachio *et al.*, 2008; Cardoso & Montoya-Burgos, 2009; Torrico *et al.*, 2009; Willis *et al.*, 2010). Estes trabalhos sustentam a ideia de que o grande momento da diversificação dos peixes Neotropicais antecede as flutuações climáticas do Pleistoceno. Segundo Rull (2008), numa meta-análise sobre a origem de vários grupos de organismos Neotropicais, quase 80% dos peixes dessa região, para os quais há estudos filogenéticos moleculares, teriam se originado antes do Quaternário (0-1,8 **ma**).

Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicar o contexto da diversificação dos peixes Neotropicais. Segundo a hipótese do “rio”, os grandes rios poderiam funcionar como barreira à dispersão tanto em organismos terrestres quanto aquáticos, promovendo divergência alopátrica (Patton *et al.*, 1994; Bates *et al.*, 1998;

Hall & Harvey, 2002; Hubert & Renno, 2006). De acordo com a hipótese “museu”, as incursões marinhas do Mioceno seriam a grande força diversificadora através da fragmentação de terras emersas, favorecendo a especiação alopátrica nessas áreas, cujas novas espécies depois se acumulariam por dispersão nas terras mais baixas (Fjeldså, 1994; Nores, 1999). Segundo Montoya-Burgos (2003) e Hubert & Renno (2006), a hipótese paleogeográfica/hidrogeológica declara que as forças de diversificação dominantes foram mudanças vicariantes no curso dos rios ou captura de rios de uma bacia pela outra devido a modificações geomorfológicas. É provável que uma ou mais dessas hipóteses ajudem a explicar a grande diversidade dos peixes Neotropicais, contudo a importância de fatores ecológicos não pode ser negligenciada como parte integrante no esclarecimento das causas da distribuição geográfica atual desses organismos.

Apesar de a hipótese de origem Miocênica da ictiofauna Sul-Americana contemporânea ser bem aceita, o contexto histórico dessa diversificação é pouco conhecido (Ribeiro, 2006). Integrar as dimensões históricas e biogeográficas na pesquisa em biodiversidade moderna tem importância central na elucidação das causas da diversidade (Beheregaray & Caccione, 2007), podendo ajudar a identificar como fatores históricos e ecológicos moldaram a evolução da ictiofauna Neotropical, desde a quebra de Gondwana até o presente (Ribeiro, 2006). Por outro lado, as incertezas taxonômicas ao nível específico em muitos táxons, aliada à falta de informações confiáveis sobre suas distribuições e à escassez de estudos sobre suas histórias filogenéticas, têm dificultado a obtenção desse tipo de informação (Vari & Weitzman, 1990). A carência de hipóteses filogenéticas para a maioria dos peixes primários de água doce dos Neotrópicos tem limitado nossa capacidade de avaliar modelos alternativos para a sua diversificação (Weitzman & Malabarba, 1998). Dessa forma, o

acúmulo desse tipo de informação é extremamente relevante para a elucidação das causas primárias da diversificação da fauna de peixes Sul-Americanos.

### **1.3-O uso de filogenias moleculares em estudos biogeográficos**

Filogenias são inferências da melhor história evolutiva de um grupo de organismos baseadas na ocorrência de características ancestrais e na existência de uma história evolutiva definida por mudanças nessas características (Swofford & Olsen, 1996). As filogenias podem ser usadas para delimitar espécies (Conceito Filogenético de Espécie), que deve ser uma linhagem monofilética derivada através de um processo evolutivo de descendência a partir de uma linhagem ancestral e diagnosticada por meio do exame de transformações no estado dos caracteres (McKittrick & Zink, 1988; Cracraft, 1989).

Atualmente, as reconstruções filogenéticas vêm tendo grande utilidade para os estudos biogeográficos, uma vez que a história geológica de uma região tem forte influência sobre a história filogenética das linhagens, considerando-se que as características de ambientes pretéritos influenciam a sobrevivência, a distribuição e a diversificação de todas as linhagens que existiram naquele local (Lomolino *et al.*, 2006). A crescente disponibilidade de árvores filogenéticas de alta resolução, aliada ao aumento na sofisticação das análises baseadas em filogenias, tem nos possibilitado acessar a influência relativa de eventos de vicariância e dispersão na distribuição dos táxons, permitindo também uma melhor capacidade técnica para lidar com a história biogeográfica em escalas de tempo mais recentes (Lomolino *et al.*, 2006).

Filogenias baseadas em marcadores moleculares têm sido muito usadas para investigar a influência de fatores ecológicos e históricos na evolução e biogeografia

histórica em diversos grupos de peixes Neotropicais devido à sua habilidade em rastrear eventos ocorridos no passado. Estes estudos têm permitido a construção de elos entre as histórias geológica e biótica de uma região, possibilitando, por exemplo, propor esquemas de colonização com base nos padrões de distribuição da variação genética no espaço (Bermingham & Martin, 1998; Cavalli-Sforza, 1998; Templeton, 1998; Martin & Bermingham, 2000; Reeves & Bermingham, 2006). As filogenias de DNA são, também, uma ferramenta muito promissora para investigações sobre a história de biomas, especialmente aqueles com alta diversidade e registro fóssil escasso (Pennington *et al.*, 2006). Além disso, quando a diversificação de linhagens é causada por isolamento geográfico, as relações filogenéticas podem indicar os tempos relativos da separação inicial dos grupos atualmente disjuntos (Lomolino *et al.*, 2006). Quando associados a divergências nucleotídicas e uma estimativa robusta da filogenia do grupo, os eventos geológicos podem ser usados para calibrar as taxas de evolução molecular, e fornecer a cronologia da diversificação de um táxon (Lundberg, 1998; Sanderson, 1998).

Dessa forma, árvores filogenéticas ao nível de espécies são essenciais para a reconstrução de eventos biogeográficos, na medida em que permitem uma melhor compreensão do contexto geográfico da especiação (Harrison, 1998; Barraclough & Vogler, 2000). Quando as separações geográficas antigas foram preservadas e refletem as distribuições atuais das espécies de uma linhagem, então a filogenia fornece não apenas uma hipótese filogenética sobre as relações evolutivas entre os táxons, mas também uma hipótese biogeográfica sobre as relações históricas entre as localidades (Lomolino *et al.*, 2006). Todavia, os padrões de especiação são mais bem estimados a partir de várias fontes de informação, devido à incerteza nas estimativas de parâmetros históricos como a distribuição geográfica de táxons à época da especiação ou se

ecologias divergentes entre espécies-irmãs são causa ou resultado de especiação (Losos & Glor, 2003).

Em animais, as inferências de filogenias moleculares baseiam-se, principalmente, em genealogias de locos de mtDNA (DNA mitocondrial), obtidas, atualmente, em número crescente devido aos diversos avanços metodológicos ocorridos nas últimas décadas, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, Saiki *et al.*, 1988) e o sequenciamento enzimático de DNA (Sanger *et al.*, 1977). O uso do mtDNA é vantajoso porque a maioria das espécies apresenta algum grau de estruturação genética para este marcador ao longo de sua área geográfica (Avise, 2004). Este padrão compartimentalizado da variação genética resulta de sua herança uniparental (usualmente materna) (Brown *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1982), que leva a menores tamanhos populacionais efetivos e, conseqüentemente, a menores tempos esperados de coalescência (Moore, 1995; Avise, 2004; Ballard & Whitlock, 2004). Em outras palavras, isso significa que as linhagens tendem a atingir o *status* de monofiletismo recíproco mais rapidamente nos locos mitocondriais do que nos nucleares. Contudo, indubitavelmente, a elevada taxa evolutiva deste marcador é sua característica mais atraente para estudos populacionais e filogenéticos, permitindo, por exemplo, traçar histórias evolutivas em análises de alta resolução de eventos recentes (como especiação rápida), estimar a estrutura populacional, analisar eventos de hibridização, avaliar fluxo gênico, entre outros (Avise, 1986; Avise & Saunders, 1987; Meyer, 1994; Avise, 2004; Clabaut *et al.*, 2005).

Em peixes, a disponibilidade de iniciadores (*primers*) universais (Kocher *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 1994; Palumbi *et al.*, 2002) para amplificação enzimática de diferentes regiões mitocondriais tem ajudado a responder questões em vários níveis taxonômicos (Kocher & Stepien, 1997). Os sítios degenerados dos genes codificadores

de proteínas e a região controle são particularmente úteis para análise de divergências mais recentes (entre populações, espécies e gêneros) (Kocher & Stepien, 1997).

O gene do Citocromo b codifica uma importante proteína transmembrana, a subunidade central da ubiquinol-citocromo c redutase, uma enzima da cadeia respiratória do metabolismo oxidativo das mitocôndrias (Kocher & Stepien, 1997; Lydeard & Roe, 1997). Este gene é encontrado no genoma mitocondrial de quase todos os eucariotos e em diversos procariotos, indicando uma origem muito antiga (Esposti *et al.*, 1993). Apesar de ser um dos genes mitocondriais mais conservados, também pode apresentar variação intraespecífica suficiente para estudos filogenéticos populacionais ou entre espécies estreitamente relacionadas, principalmente na terceira base do códon (Kocher *et al.*, 1989). Como outros genes do mtDNA, também exibe variação na taxa de substituição entre as posições do códon e em tipos de substituição (Irwin *et al.*, 1991; Lydeard & Roe, 1997), uma vez que as transições (mudanças entre bases púricas ou pirimídicas) são 10 vezes mais frequentes do que as transversões (mudanças de bases púricas por pirimídicas ou vice-versa), especialmente na terceira posição do códon (Brown *et al.*, 1982). Por conta dessa heterogeneidade, o Citocromo b tem sido empregado para resolver relações filogenéticas mais antigas (Meyer & Wilson, 1990; Irwin *et al.*, 1991; Lydeard & Roe, 1997; Akihito *et al.*, 2000; Kumazawa & Nishida, 2000; Farias *et al.*, 2001), embora seja útil, também, para aquelas mais recentes, mas com uma resolução mais limitada (Zardoya & Doadrio, 1999; Lovejoy & Araújo, 2000; Martin & Bermingham, 2000).

A alta taxa de evolução do mtDNA é, ao mesmo tempo, o diferencial e também a fraqueza desse marcador. Regiões codificantes de alta taxa de mutação tendem a ter sua informação filogenética, principalmente nos sítios mais informativos (terceira posição do códon), apagada devido às múltiplas substituições que podem ocorrer no

mesmo sítio nucleotídico. Estima-se que isto reduza a confiabilidade nas inferências de relações evolutivas acima de 30-40% de divergência para marcadores mitocondriais menos conservados (Meyer, 1994; Lydeard & Roe, 1997). Além disso, casos de heteroplasmia (moléculas de mtDNA diferentes em um mesmo organismo) não são raros (Curtis *et al.*, 2001), inclusive em peixes (Bermingham *et al.*, 1986; Arnason & Rand, 1992), o que aumenta as chances de recombinação (Ladoukakis & Zouros, 2001), um evento que também apaga a informação histórica contida na molécula. Além disso, a herança materna reflete apenas uma perspectiva da evolução, ou seja, a história matrilinear da herança, que pode diferir daquela da população ou da espécie (Cronin, 1993; Harpending *et al.*, 1998; Zhang & Hewitt, 2003), podendo não resgatar padrões genealógicos representativos da história filogenética, especialmente quando vieses relacionados ao sexo afetam o valor adaptativo ou o padrão de dispersão (Hoelzer, 1997). Estas características, em conjunto, podem afetar a fidedignidade (inserindo inconsistências estatísticas nas filogenias) da estimativa da árvore da espécie entre as possíveis árvores de genes (Moore, 1995; Foster & Hickey, 1999; Lopez *et al.*, 2002), o chamado “dilema da árvore de genes *versus* árvore de espécies” (Pamilo & Nei, 1988; Fitch, 1970).

Por outro lado, o uso de múltiplos locos não-ligados proporciona uma visão mais abrangente do genoma (Nielsen & Slatkin, 2000; Sunnucks, 2000), reduzindo o erro decorrente da alta estocasticidade da estimativa da árvore gênica a partir de um único marcador (Wakeley & Hey, 1997; Harpending *et al.*, 1998; Kuhner *et al.*, 1998). Essas réplicas funcionam como amostras independentes do processo evolutivo, aumentando a confiabilidade na estimativa da árvore da espécie (Zhang & Hewitt, 2003) e reduzindo, inversamente pelo número de réplicas, a variância nas estimativas dos tempos de divergência (Edwards & Beerli, 2000). Essa abordagem também pode identificar locos

sob seleção, com padrões que desviam das expectativas baseadas nas histórias populacionais e demográficas, que até podem imitar histórias demográficas alternativas (Hare, 2001). Como a seleção age localmente, enquanto eventos demográficos deixam “assinaturas” comuns em todos os locos neutros (Fu & Li, 1999; Avise, 2000), as réplicas permitem identificar tais marcadores e eliminá-los das análises, se necessário.

Os locos nucleares são a única opção de réplica às genealogias de mtDNA, sendo considerados fundamentais para abordagens biogeográficas mais amplas, na forma de testes de histórias complexas (Fu & Li, 1999; Hare, 2001). Em peixes, o uso de marcadores nucleares em estudos filogenéticos tem envolvido genes para RNA ribossômico (Stock & Whitt, 1992; Phillips & Oakley, 1997), bem como genes do sistema MHC (complexo principal de histocompatibilidade; Klein *et al.*, 1997), genes de quinases (Meyer & Lydeard, 1993; Parker, 1997; Banford *et al.*, 2004), gene da epidimina (Ortí & Meyer, 1996), gene do hormônio do crescimento (Bernardi *et al.*, 1993), genes de fatores de transcrição (EF1 $\alpha$ -6, Moyer *et al.*, 2004), gene Rag (gene ativador de recombinação; Sullivan *et al.*, 2000; Lovejoy & Collette, 2001; Hardman, 2002; Hardman & Page, 2003; Hardman, 2004; Grande *et al.*, 2004; Lavoué & Sullivan, 2004; López *et al.*, 2004; Quenouille *et al.*, 2004; Calcagnotto *et al.*, 2005; Naylor *et al.*, 2005; Hardman & Lundberg, 2006; Sullivan *et al.*, 2006), gene da proteína ribossomal S7 (Pretti *et al.*, 2009), entre outros.

Entretanto, para estudos de estrutura populacional e reconstruções filogenéticas entre espécies estreitamente relacionadas são exigidas regiões de maior variabilidade, como os íntrons (Lessa, 1992; He & Haymer, 1997; Friesen, 2000), regiões intercaladas aos éxons de genes eucariotos removidas durante a maturação do RNA precursor (Zhang & Hewitt, 2003). Estes marcadores nucleares evoluem três vezes mais rápido do

que os éxons adjacentes a eles (Palumbi, 1995; Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Hassan *et al.*, 2002).

Embora seja crescente o uso dos polimorfismos de locos nucleares para reconstruções filogenéticas, há desafios analíticos e metodológicos a serem superados, como a ocorrência de recombinação, seleção, heterozigosidade, indels (inserções e deleções), baixas divergências, etc, que podem dificultar a reconstrução da história evolutiva de um grupo e confundir a interpretação dos resultados (Brown *et al.*, 1979; Avise, 1989; Clark, 1990; Palumbi & Baker, 1994; Ortí *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999; Schierup & Hein, 2000; Posada, 2001; Antunes *et al.*, 2002; Zhang & Hewitt, 2003). Em teoria, espera-se uma resolução menos pronunciada em locos nucleares autossômicos devido as suas baixas taxas de evolução e ao seu maior *N<sub>e</sub>* (tamanho populacional efetivo), em comparação ao mtDNA, decorrente da sua diploidia e herança biparental (Avise, 2000). Nesses casos, a aleatoriedade que caracteriza a deriva genética, enquanto mecanismo evolutivo, tende a diferenciar mais lentamente as linhagens de marcadores nucleares (Moore, 1995; McCauley, 1995; Templeton, 1998; Avise, 2000). Entretanto, a baixa taxa de evolução do DNA nuclear também minimiza homoplasias entre táxons filogeneticamente mais distantes (Avise, 2004; Li *et al.*, 2007). Além disso, embora a separação dos polimorfismos seja mais lenta, a informação temporal retida por esses marcadores permite que processos populacionais que ocorreram antes, durante e após eventos de especiação sejam estudados (Hoelzer, 1997; Wakeley & Hey, 1997; Nichols, 2001). As genealogias nucleares oportunizam, ainda, o estudo de fluxo gênico diferencial entre locos, podendo explicar os mecanismos de especiação, se houver padrões de diferenciação específicos mediados por seleção em alguns deles (Hare, 2001).

Além da disponibilidade de novos marcadores, a aplicação de novas metodologias analíticas tem tornado mais robustas as reconstruções de árvores filogenéticas a partir de dados moleculares. Um desses avanços é a Máxima Verossimilhança (MV), que consiste em uma metodologia geral para estimativa de parâmetros de um modelo e para teste de hipóteses a respeito destes parâmetros (Yang, 2006). A verossimilhança pode ser traduzida como a probabilidade de um conjunto de dados em relação a uma hipótese. Assim, a hipótese que maximiza o valor assumido pela verossimilhança é dita aquela de Máxima Verossimilhança (Felsenstein, 2004). A aplicação da MV para filogenias moleculares foi introduzida por Felsenstein (1981). As verossimilhanças de uma dada árvore são calculadas a partir de um alinhamento de sequências de DNA com  $m$  sítios nucleotídicos, uma filogenia, comprimentos de ramos e um modelo evolutivo que permita o cálculo de probabilidades de mudanças nucleotídicas ao longo da árvore (Yang, 2006). Dessa forma, a inferência filogenética por Máxima Verossimilhança determina a topologia da árvore, os comprimentos dos ramos e os parâmetros do modelo evolutivo que maximizam a probabilidade de se observar as sequências em mãos (Schmidt & Haeseler, 2009).

#### **1.4-A situação sistemática e taxonômica do gênero *Pseudoplatystoma***

Os peixes constituem metade das 48 mil espécies de vertebrados conhecidas e estão distribuídos em 57 ordens e 482 famílias (Nelson, 2006). A ictiofauna Neotropical é a mais diversa do mundo, representando 46% de todas as espécies contemporâneas de peixes de água doce e cerca de 10% de todas as espécies de vertebrados atuais (Vari & Malabarba, 1998; Reis *et al.*, 2003). Entre os teleósteos Neotropicais encontram-se os

Osteoglossiformes (ex. pirarucu), Characiformes (ex. curimatás), Gymnotiformes (peixes elétricos) e muitas famílias de Siluriformes (bagres) (Albert *et al.*, 2006).

Os bagres são um dos grupos de peixes economicamente mais importantes do mundo para a pesca comercial, piscicultura, aquariofilia, etc (Teugels, 1996). Ocorrem em todos os continentes, compreendendo 34 famílias e 2.405 espécies, das quais 2.280 vivem exclusivamente em água doce (1.300 apenas nos Neotrópicos) (Nelson, 2006). Os bagres Neotropicais estão classificados em 15 famílias: Ariidae, Astroblepidae, Aspredinidae, Auchenipteridae, Callichthyidae, Cetopsidae, Diplomystidae, Doradidae, Heptapteridae, Loricariidae, Nematogenyidae, Pimelodidae, Pseudopimelodidae, Scoloplacidae e Trichomycteridae. A família Pimelodidae apresenta os maiores representantes dos Siluriformes na região Neotropical, com mais de noventa espécies e 30 gêneros (Lundberg & Littmann, 2003; Ferraris Jr., 2007), incluindo peixes migradores de grandes distâncias (Barthem & Goulding, 1997; Ruffino *et al.*, 2000; Carolsfeld *et al.*, 2003). Estudos morfológicos, motivados por lacunas taxonômicas no grupo e baseados em sinapomorfias não-ambíguas (Lundberg & McDade, 1986; De Pinna, 1993; De Pinna 1998; Shibatta, 1998; Shibatta, 2003; Lundberg *et al.*, 2000; Bockmann & Guazzelli, 2003; Ferraris Jr., 2003; Lundberg & Littmann, 2003), levaram ao desmembramento dessa família (Diogo, 2003, 2004), com a reclassificação de algumas espécies nas famílias Pseudopimelodidae e Heptapteridae (Sullivan *et al.*, 2006).

Os peixes do gênero *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862) são pimelodídeos que, como os outros bagres, possuem barbilhões na região maxilar envolvidos na identificação de estímulos químicos, um importante meio de comunicação para peixes de hábitos noturnos e de águas turvas (Todd, 1983; Valentincic & Caprio 1994). São caracterizados pela presença de uma cabeça deprimida, um processo occipital estendido

posteriormente (em contato com a placa pré-dorsal) e uma fontanela muito longa (Buitrago-Suárez & Burr, 2007). Sua pigmentação consiste de bandas escuras e pálidas, bandas reticuladas e manchas circulares escuras (Buitrago-Suárez, 2006). Esta é a classificação atualmente aceita para o grupo segundo Nelson (2006):

Filo: Chordata

Classe: Actinoptergii

Subclasse: Neoptergii

Divisão: Teleostei

Subdivisão: Otocephala

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae

Subfamília: Sorubiminae

Gênero: *Pseudoplatystoma*

Seu hábito carnívoro (inclusive com a prática de canibalismo) exerce forte pressão sobre os elos inferiores da cadeia trófica aquática (Barthem & Goulding, 1997; Agudelo-Córdoba *et al.*, 2000), desempenhando, por isso, um importante papel ecológico (regulação *topdown*) em habitats aquáticos diversos, como o canal principal de grandes rios, lagos e florestas inundadas das mais importantes bacias hidrográficas da América do Sul (Reid, 1983; Burgess, 1989). Apresentam migrações laterais complexas entre rios, lagos e planícies de inundação, bem como movimentos longitudinais ao longo do canal dos rios na estação reprodutiva (Barthem & Goulding, 1997).

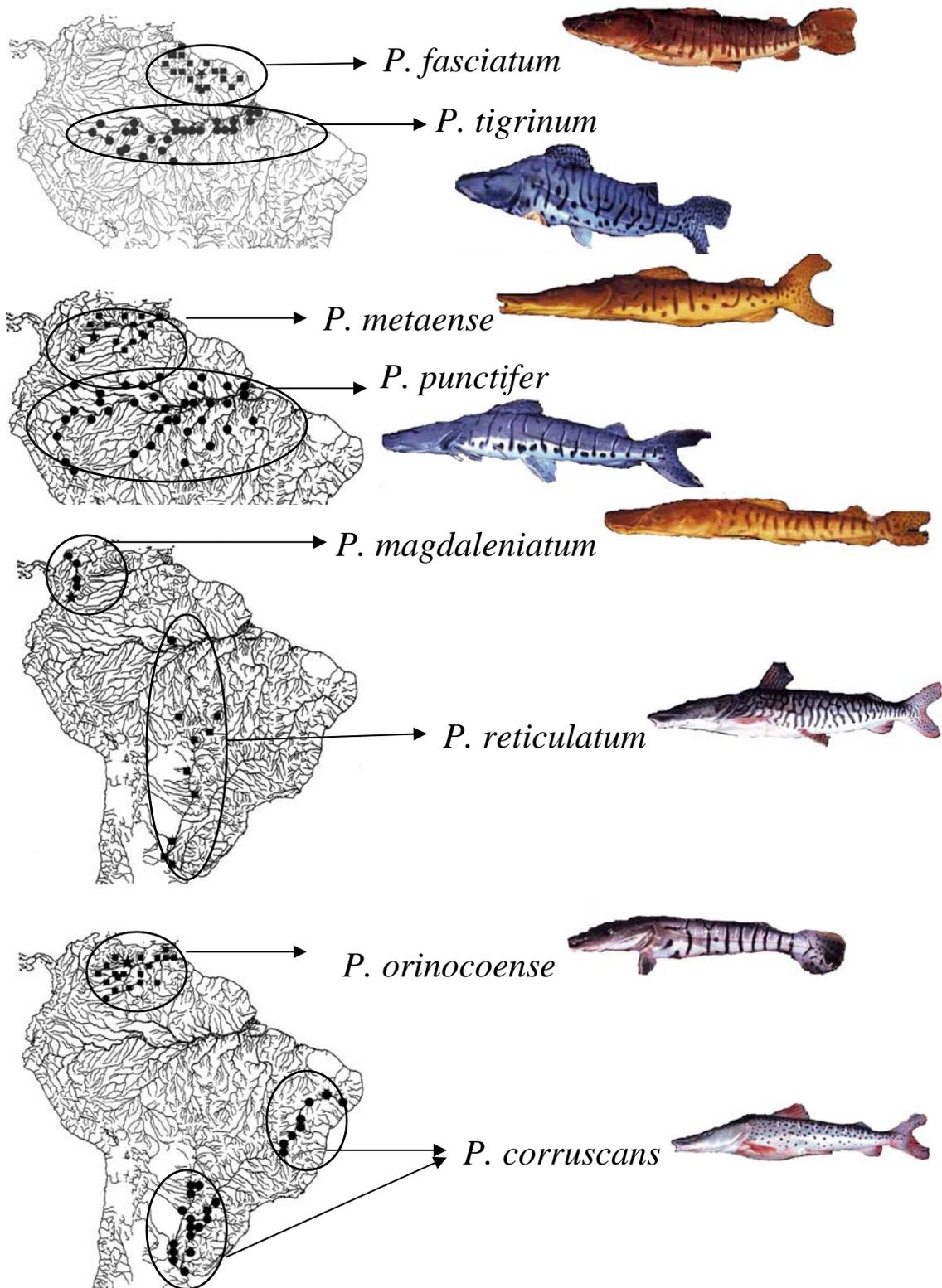
Esses bagres têm alto valor econômico, com uma produção pesqueira estimada em 11.168 toneladas em 2007 (IBAMA, 2007), representando 4,6 % de toda a produção pesqueira extrativista continental do país. Entretanto, este recurso pesqueiro tem sido bastante afetado pela construção de barragens para usinas hidroelétricas, mudanças

ambientais decorrentes da poluição da água, mau gerenciamento de estações de piscicultura, sobrepesca, devastação de florestas de galeria, etc, que têm reduzido drasticamente seu estoque nativo e intensificado o interesse conservacionista nessas espécies (Miranda & Ribeiro, 1997; Revaldaves *et al.*, 2005). Um exemplo disso é a inclusão de *Pseudoplatystoma corruscans* na lista de espécies de peixes ameaçados do mundo (Mello *et al.*, 2009). Além disso, Lozano (2005) indica que *P. metaense* está em situação de sobrepesca no Rio Apure, afluente do Orinoco. Entretanto, não há avaliação alguma sobre o *status* de conservação das populações da maior parte das espécies do grupo.

Sua biologia (Cordiviola, 1966; Goulding, 1980; Reid, 1983; Kossowski & Madrid, 1986; Loubens & Aquim, 1986; Valderrama *et al.*, 1988; Reyes & Huq, 1990; Goulding *et al.*, 1996; Ruffino & Isaac, 1999; Loubens & Panfili, 2000; Duque & Winemiller, 2003; Lozano, 2005; Rojas *et al.*, 2007) e genética (Oliveira *et al.*, 1988; Swarça *et al.*, 2000; Sekine *et al.*, 2002; Gallo & Díaz-Sarmiento, 2003; Souza, 2003; Coronel *et al.*, 2004; Revaldaves *et al.*, 2005; Swarça *et al.*, 2005; Escobar & Taphorn, 2006; Carvalho-Costa & Galetti, 2007a,b; Carvalho-Costa *et al.*, 2007; Carvalho-Costa *et al.*, 2008; Carvalho-Costa *et al.*, 2009ab; Pereira *et al.*, 2009; Torrico *et al.*, 2009) têm sido alvo de diversos estudos. *Pseudoplatystoma* é considerado um gênero monofilético (Buitrago-Suárez, 2006) e evolutivamente próximo a *Hemisorubim*, *Sorubimichthys*, *Sorubim* e *Zungaro* (Lundberg *et al.*, 1991; De Pinna, 1993, 1998). Apenas três espécies, nenhuma das quais distribuídas nas drenagens trans-Andinas, eram reconhecidas até há pouco tempo (Burgess, 1989, Lundberg & Littmann, 2003): *P. corruscans* (Spix & Agassiz, 1829), ou “pintado”, com distribuição restrita às bacias do São Francisco e no sistema Paraná-Paraguai-Uruguaí; *P. fasciatum* (Linnaeus, 1766), ou “surubim/cachara”, a espécie mais amplamente distribuída do gênero, ocorrendo nas

bacias do Amazonas, Magdalena, Orinoco, Paraná-Paraguai, Tocantins-Araguaia, pequenas drenagens da região das Guianas e em rios do Estado do Maranhão; e *P. tigrinum* (Valenciennes, 1840), “surubim tigre/caparari”, distribuído nas bacias do Amazonas e Orinoco.

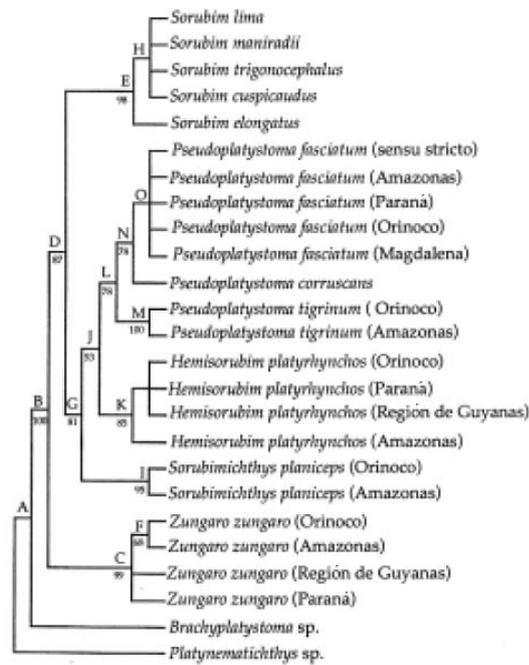
Contudo, Buitrago-Suárez (2006) e Buitrago-Suárez & Burr (2007) argumentaram que a diversidade do grupo estava subestimada, resultado do pouco conhecimento sobre a sistemática do grupo, que apresentava grande variação geográfica em morfologia e coloração. As populações de *P. tigrinum* e *P. fasciatum* de diferentes bacias eram muito distintas e poderiam corresponder a novas espécies (Buitrago-Suárez, 2006). Dessa forma, Buitrago-Suárez & Burr (2007) revisaram o gênero, o que resultou em oito espécies válidas (Figura 2). Pela nova classificação, as populações antes reconhecidas como *P. fasciatum* assumem a seguinte terminologia taxonômica e distribuição geográfica: *P. fasciatum* agora é restrito às pequenas bacias da região das Guianas; *P. punctifer* está distribuído em toda a bacia Amazônica e Tocantins-Araguaia; *P. orinocoense* engloba apenas peixes da bacia do Orinoco; *P. magdaleniatum* é a nova terminologia para os peixes do Rio Magdalena; *P. reticulatum* é uma espécie presente apenas na bacia do Paraná-Paraguai, e também na região central do Amazonas. Em relação a *P. tigrinum*, a população amazônica permaneceu com o mesmo nome, enquanto os peixes do Rio Orinoco ficaram conhecidos como *P. metaense*. *P. corruscans* continuou com a mesma denominação e área de distribuição da classificação anterior.



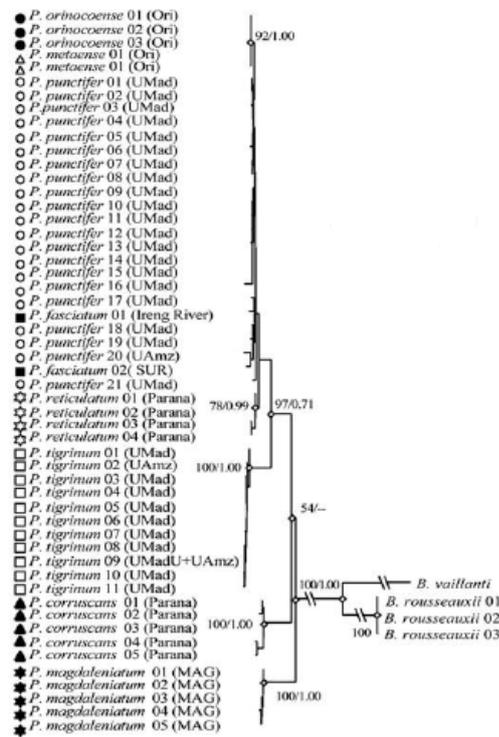
**Figura 2:** Distribuição das oito espécies de *Pseudoplatystoma* resultantes da revisão de Buitrago-Suárez & Burr (2007) (figuras editadas a partir de Buitrago-Suárez & Burr, 2007).

Atualmente existem duas hipóteses filogenéticas para o grupo. Buitrago-Suárez (2006) abordou a história evolutiva do gênero empregando caracteres morfológicos, que revelaram relações de parentesco evolutivo não muito resolvidas (Figura 3). Mais recentemente, a questão da sistemática e taxonomia de *Pseudoplatystoma* foi retomada em um estudo de filogenia molecular por meio de marcadores mitocondriais (Figura 4) (Torrìco *et al.*, 2009). Neste estudo, foram encontrados clados monofiléticos para *P. tigrinum*, *P. corruscans*, *P. reticulatum*+*P. punctifer*+*P. fasciatum* e *P. magdaleniatum*. Além disso, os dois clados sugeridos em Buitrago-Suárez (2006) (Figura 3), a saber, o “clado *P. fasciatum*” (*P. fasciatum*, *P. punctifer*, *P. reticulatum*, *P. orinocoense*, *P. magdaleniatum* e *P. corruscans*) e o “clado *P. tigrinum*” (*P. tigrinum* e *P. metaense*), não foram recuperados pela filogenia.

Apesar desses avanços no conhecimento da história natural e da sistemática do grupo, ainda restam questões a serem respondidas, como por exemplo, a situação de *P. orinocoense* e *P. metaense*, a existência de populações coespecíficas em diferentes bacias, a realidade de *P. reticulatum* como espécie etc. Buitrago-Suárez (2006), Buitrago-Suárez & Burr (2007) e Torrìco *et al.* (2009) não amostraram a maior parte da distribuição geográfica do gênero na América do Sul, o que pode resultar em uma inferência incompleta das relações evolutivas entre os clados. Além disso, a abordagem molecular em Torrìco *et al.* (2009) emprega apenas genealogias de mtDNA, que representam apenas um painel da evolução. Dessa forma, esse trabalho tenta preencher algumas dessas lacunas no conhecimento sobre as relações evolutivas e a situação sistemática do grupo, bem como sobre os padrões de diversificação de *Pseudoplatystoma* no espaço e no tempo.



**Figura 3:** Filogenia do gênero *Pseudoplatystoma* baseada em dados morfológicos (Buitrago-Suárez, 2006).



**Figura 4:** Filogenia molecular do gênero *Pseudoplatystoma* com base na região controle do DNA mitocondrial (Torrice *et al.*, 2009).

## **2-OBJETIVOS**

### **2.1-Objetivos Gerais**

-Avaliar, por meio de filogenias moleculares, a situação sistemática e a taxonomia vigente para o gênero *Pseudoplatystoma* e usar essa informação para examinar as relações entre as linhagens e sua distribuição geográfica na América do Sul.

### **2.2-Objetivos Específicos**

-Propor uma filogenia molecular para as espécies de *Pseudoplatystoma* utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear,

-Comparar essa proposta de filogenia molecular com a filogenia morfológica de Buitrago-Suárez (2006) e a filogenia molecular em Torrico *et al.* (2009) a fim de avaliar o número de espécies e a taxonomia do grupo, por meio da Sistemática Molecular;

-Acessar os papéis da dispersão e de eventos vicariantes sobre os padrões de distribuição dos haplótipos de *Pseudoplatystoma*, relacionando-os com os principais eventos geológicos que atuaram na formação das bacias hidrográficas da América do Sul.

### 3-MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1-Locais de amostragem e extração de DNA

Amostras das oito espécies de *Pseudoplatystoma* (*sensu* Buitrago-Suárez & Burr, 2007) foram obtidas de quase todas as bacias hidrográficas onde esses peixes estão distribuídos, exceto os rios Gurupi e Munin (Maranhão) e de algumas drenagens das Guianas (Tabela 1, Figura 5). A identificação do material foi feita inicialmente com base na antiga taxonomia, uma vez que a revisão de Buitrago-Suárez & Burr (2007) não estava disponível na época da amostragem. Entretanto, considerando que a nova taxonomia é na maior parte concordante com a distribuição das espécies por bacias hidrográficas, foi necessário apenas atualizar a terminologia taxonômica seguindo Buitrago-Suárez e Burr (2007). Esta abordagem nos permitiu acessar a comparabilidade da antiga e nova taxonomia com as relações filogenéticas obtidas para o gênero no presente estudo, funcionando de forma comparável a uma hipótese nula. Espécimes *vouchers* estão disponíveis na Coleção de Peixes do Laboratório de Hidrobiologia, da Universidade Federal do Maranhão (São Luis-MA) (para os peixes das bacias maranhenses), e na Coleção da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos (Filadélfia). Entretanto, grande parte dos espécimes usados neste estudo possui apenas registro fotográfico.

As extrações de DNA foram feitas utilizando-se tecidos de nadadeira ou brânquias (preservados em etanol 100%), por meio de *kit* comercial (*DNeasy Blood and Tissue*, *QIAGEN* Inc.), de acordo com as instruções do fabricante, ou seguindo o protocolo desenvolvido por Aljanabi & Martinez (1997), conhecido como Método do Tampão Salino, descrito com modificações, abaixo:

- 1-Aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de nadadeira caudal foi cortado em pedaços menores e adicionados a 700 µl de solução tampão salino (NaCl 0,4M; Tris-HCl 10 mM pH=8,0 e EDTA pH=8,0 2mM) em microtubos de 2 ml;
- 2-Foram adicionados 80 µl de SDS 20% (Sulfato Duodecil de Sódio) (Cf=2%) e 16 µl de Proteinase K 20 mg/ml (Cf=400 mg/ml);
- 3-As amostras foram incubadas a 55°C por aproximadamente 16 horas;
- 4-Adicionou-se 300 µl de NaCl 6M;
- 5-As amostras foram misturadas em vórtex por 30s à velocidade máxima;
- 6-Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 13.000 rpm e o sobrenadante transferido para outro tubo estéril;
- 7-Um volume igual de isopropanol foi adicionado, agitando-se vagarosamente as amostras para que ocorresse a precipitação do DNA;
- 8-As amostras foram centrifugadas por 20 min a 13.000 rpm;
- 9-O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 70%;
- 10- As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min;
- 11-O sobrenadante foi descartado e o restante do álcool foi evaporado em estufa (37 °C) durante 60-120 min;
- 12-Depois a secagem, o *pellet* foi ressuscitado em solução de 100-200 µl de TE (Tris-HCl-EDTA) e armazenado em *freezer* a -20°C.

**Tabela 1:** Espécies analisadas, localidade das amostras e número total de indivíduos sequenciados para cada marcador molecular.

Táxon	Drenagem	Localidade	Citb	Rag1	S7
<i>P. punctifer</i>	Turiaçu	Santa Helena (Brasil)	10	10	2
<i>P. punctifer</i>	Pindaré	Pindaré-Mirim (Brasil)	28	25	17
<i>P. punctifer</i>	Mearim	Lago-Açu-(Brasil)	22	26	12
<i>P. punctifer</i>	Itapecuru	Codó (Brasil)	2	2	1
		Rosário (Brasil)	1	-	-
<i>P. punctifer</i>	Parnaíba	São João dos Patos (Brasil)	2	3	-
		Guadalupe (Brasil)	1	-	-
		Santa Quitéria (Brasil)	1	6	-
<i>P. punctifer</i>	Tocantins	Tucuruí (Brasil)	2	2	-
<i>P. punctifer</i>	Araguaia	Cocalinho (Brasil)	1	1	1
<i>P. punctifer</i>	Amazonas (Solimões, Rio Branco, Xingú)	Iquitos (Peru)	4	4	2
		Tabatinga (Brasil)	13	8	6
		Tefé (Brasil)	1	1	-
		Manaus (Brasil)	5	3	-
		Boa Vista (Brasil)	2	3	-
		Iriri (Brasil)	6	4	-
<i>P. reticulatum</i>	Paraguai	Cuiabá (Brasil)	13	4	8
		Taquari (Brasil)	3	4	2
		São Lourenço (Brasil)	1	1	-
		Miranda (Brasil)	5	3	4
<i>P. reticulatum</i>	Paraná	Corrientes (Argentina)	-	1	-
<i>P. metaense</i>	Orinoco	Atabapo (Venezuela)	4	1	-
		Parguaza (Venezuela)	2	-	-
		Cinaruco (Venezuela)	2	-	-
		Caura (Venezuela)	5	2	-
		Puerto Ayacucho (Venezuela)	2	5	1
		Portuguesa (Venezuela)	1	1	1
		Matyure (Venezuela)	1	1	-
		Tucupita (Venezuela)	2	3	3
		Caño Arapuca (Venezuela)	3	1	2
Arichuna (Venezuela)	1	-	-		

		Villavicencio (Colômbia)	-	4	3
		Caicara Del Orinoco (Venezuela)	-	2	1
<i>P. orinocoense</i>	Orinoco	Curamoni (Venezuela)	3	3	2
		Cinaruco (Venezuela)	1	-	2
		Puerto Ayacucho (Venezuela)	4	2	1
		Villavicencio (Colômbia)	10	4	5
		Portuguesa (Venezuela)	2	3	4
		Tucupita (Venezuela)	3	1	4
		Caicara del Orinoco (Venezuela)	1	2	1
		Puerto Paez (Venezuela)	1	1	1
		Caño La Guardia (Venezuela)	-	-	1
		Parguaza (Venezuela)	-	2	-
		Caura (Venezuela)	-	2	3
		Atabapo (Venezuela)	-	1	-
		Arichuna (Venezuela)	-	-	1
<i>P. fasciatum</i>	Rupununni	Karasabi (Guiana)	1	1	1
		Yupucari (Guiana)	2	2	-
	Suriname	Desconhecido (Suriname)	1	1	-
<i>P. tigrinum</i>	Amazonas (Solimões)	Iquitos (Peru)	5	6	3
		Tabatinga (Brasil)	6	6	3
		Santarém (Brasil)	2	3	-
		Tefé (Brasil)	2	3	-
<i>P. corruscans</i>	Paraguai	Cuiabá (Brasil)	10	5	3
		Taquari (Brasil)	2	3	-
		São Lourenço (Brasil)	5	5	2
		Rio Miranda (Brasil)	2	5	-
<i>P. corruscans</i>	Paraná	Rio Grande (Brasil)	3	2	2
		Corrientes (Argentina)	2	2	-
<i>P. corruscans</i>	Uruguai	Itapiranga (Brasil)	5	5	4
<i>P. corruscans</i>	São Francisco	Três Marias (Brasil)	22	15	7
<i>P. magdaleniatum</i>	Magdalena	Neiva (Colômbia)	4	12	6



**Figura 5:** Locais de amostragem para as espécies de *Pseudoplatystoma* nas bacias hidrográficas da América do Sul. Números representando as localidades e tamanhos amostrais estão indicados na Tabela 1.

Após o procedimento de extração, o DNA das amostras foi avaliado quanto à sua qualidade e quantidade, por meio de eletroforese (30 min a 100 volts) em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (1 mg/ml). Após a corrida, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. A presença de uma banda espessa com alto peso molecular foi o critério usado para avaliar a qualidade do DNA extraído. A quantificação do DNA deu-se por comparação da intensidade das bandas do gel com um marcador de tamanho cujas bandas possuem concentrações de DNA, em  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ , conhecidas (*Low DNA Mass Ladder, Invitrogen Life Technologies*). Todas as amostras foram diluídas para a concentração 50  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$  para serem usadas como molde na amplificação dos marcadores de interesse.

### **3.2-Amplificação enzimática dos marcadores de DNA mitocondrial e nuclear**

Foram amplificados, por meio de PCR, o gene mitocondrial do Citocromo b (Citb; 1140 pb, pares de base), o primeiro íntron do gene Rag1 (gene ativador de recombinação; Rag1int1,  $\pm$  800 pb) e o primeiro íntron do gene da proteína ribossomal S7 (S7int1,  $\pm$  1000 pb). O produto do gene Rag1 está envolvido na ativação do mecanismo conhecido por V(D)J, responsável pela junção de segmentos de genes para linfócitos T e B, um processo de recombinação ordenado e altamente regulado que leva à formação de um gene inteiramente funcional (Cortes *et al.*, 1994). O gene da proteína ribossomal S7 (rps7) codifica a maior proteína da subunidade 40S do ribossomo (Synetos *et al.*, 1992). As amplificações ocorreram em volume final de 30  $\mu\text{l}$  contendo 10-50  $\eta\text{g}$  de DNA, 100  $\mu\text{M}$  de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, e KCl 500 mM), 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primer, 1,5-2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U da enzima Taq polimerase (*Invitrogen Life Technologies*). As reações foram

conduzidas em termociclador PTC100 (MJ Research) ou Mastercycler (Eppendorf) seguindo o programa de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos (min), seguido de 35 ciclos de 30 segundos (s) a 94°C, 35 s à temperatura de hibridização dos *primers* (Tabela 2), 40 s a 72°C; 72°C por 5 min. Para cada rodada de reações foi utilizado um controle negativo contendo água ao invés de DNA. Após as reações, 3 µl de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (1 mg/ml), e submetidos à eletroforese (100 volts por 45 minutos). Posteriormente, este gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e foto-documentado (Kodak 1D 3.5), usando-se um marcador de 1 Kb (Kilobase, *Invitrogen Life Technologies*) como referência de tamanho para as bandas amplificadas.

Os iniciadores (*primers*) para o *Citb* e *S7int1* estavam disponíveis na literatura (Tabela 2). Entretanto, para o íntron do *Rag1* não havia sequências de *primers* publicadas, de modo que foi necessário desenvolvê-los para este estudo. Sequências dos éxons 1 e 2 do gene *Rag1*, disponíveis para outros grupos de peixes no GenBank, foram alinhadas e sobre suas regiões mais conservadas foram desenhados os iniciadores *forward* (5'-3'), na extremidade 3' do éxon 1 mais próxima do íntron, e *reverse* (3'-5'), na extremidade 5' do éxon 2 mais próxima do íntron. Para escolha da melhor região candidata e configuração dos parâmetros de hibridização dos *primers* usou-se programa PRIMER 3 (Rozen & Skaletsky, 2000).

Os produtos de PCR foram purificados mediante o uso de *kit* de purificação comercial (*Illustra GFX PCR DNA And Gel Band Purification, GE Healthcare*), de acordo com o manual do fabricante. Os fragmentos de DNA foram sequenciados pelo método enzimático de terminação de cadeia (Sanger *et al.*, 1977), empregando-se o *Kit* de sequenciamento *EtDye (GE HealthCare)* e sequenciadores automáticos MegaBACE 1000 (*GE HealthCare*) e ABI 377 (*Applied Biosystems Inc.*). Como não foi encontrada

variação de tamanho em nenhum dos marcadores, optou-se pelo sequenciamento direto dos produtos de PCR com ambos os *primers* de amplificação.

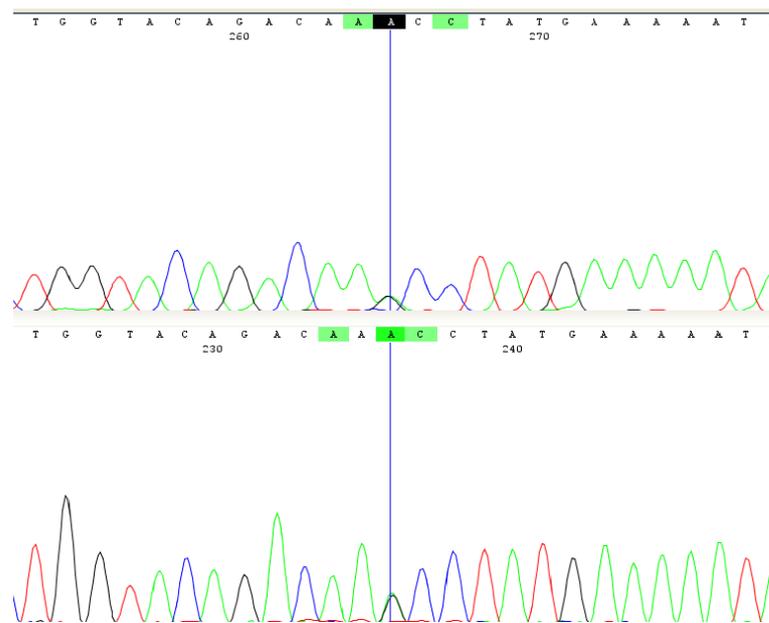
**Tabela 2:** Iniciadores (*primers*) usados nas reações de amplificação dos marcadores empregados neste estudo. Th= temperatura de hibridização; Fwd= *forward*; Rev= *reverse*; Y= pirimidinas, R= purinas.

Iniciador	Sequência (5'→3')	Th (°C)	Referência
Gludgl-Fwd	TGACTTGAARAACCAAYCGTTG	49	Palumbi <i>et al.</i> (2002)
H15915-Rev	AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC	49	Irwin <i>et al.</i> (1991)
Rag1 X1-Fwd	GCTGGCAGACAAGTGGATCT	58	Este estudo
Rag1 X2-Rev	AGGCCATCTAGAAGCCTTGC	58	Este estudo
S7RPEX1-Fwd	TGGCCTCTTCCTTGGCCGT	56	Chow & Hazama (1998)
S7RPEX2-Rev	AACTCGTCTGGCTTTTCGCC	56	Chow & Hazama (1998)

### 3.3-Análises filogenéticas

Apenas aquelas sequências de nucleotídeos cujos eletroferogramas apresentavam picos de bases bem definidos e com pouco ruído foram consideradas para as análises. Essas sequências foram observadas no programa CODONCODE 3.0 (Codoncode Corporation), e alinhadas no CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), presente no BIOEDIT (Hall, 1999). Sítios nucleotídicos heterozigotos nos marcadores nucleares foram identificados por meio da observação de picos de bases diferentes sobrepostos nos eletroferogramas das sequências *forward* e *reverse*, como mostrado na Figura 6. As amostras que apresentaram mais de um sítio ambíguo foram resolvidas estatisticamente com o auxílio do programa PHASE 2.1 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly,

2003), que emprega a estatística Bayesiana para a reconstrução de haplótipos. PHASE combina o *prior* coalescente aproximado de Stephens *et al.* (2001) com uma estratégia conhecida por “dividir-e-derrotar” (*divide-and-conquer*) ou Ligação de Partição (Niu *et al.*, 2002). De acordo com Stephens *et al.* (2004), o algoritmo divide, ao acaso, as sequências dos haplótipos em segmentos de locos consecutivos, computando uma lista de haplótipos plausíveis dentro de cada segmento. Então, repetidamente, os segmentos são combinados para se obter outra lista de haplótipos plausíveis com a melhor estimativa para o par de haplótipos de cada indivíduo e sua respectiva probabilidade. Apenas probabilidades posteriores maiores do que 0,9 foram consideradas em nossa análise, se repetidas ao longo de cinco rodadas de 500 iterações cada. Indivíduos heterozigotos para um único sítio nucleotídico tiveram suas fases genotípicas resolvidas manualmente, e depois inseridos na análise como forma de tornar o procedimento de inferência dos haplótipos desconhecidos mais acurado. Experimentos com dados simulados e reais indicam que este método fornece uma melhor estimativa para a reconstrução de haplótipos do que outros métodos existentes (Stephens *et al.*, 2001).



**Figura 6:** Alinhamento mostrando, nos eletroferogramas de sequências *forward* e *reverse* de um mesmo indivíduo, um sítio heterozigoto A/G.

A identificação de possíveis eventos de recombinação nos marcadores nucleares foi conduzida no RDP3 3.34 (Martin *et al.*, 2005). A caracterização do polimorfismo foi feita nos programas MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) e DNASP v5 (Librado & Rozas, 2009). Indels (inserções/deleções), quando presentes nos íntrons, foram codificados e incorporados nas análises filogenéticas. Distâncias-*p* não corrigidas foram calculadas no MEGA para comparações pareadas entre os táxons. A neutralidade seletiva do polimorfismo dos marcadores foi examinada pelos testes D de Tajima (Tajima, 1989), F\* e D\* (Fu & Li, 1993), presentes no DNASP.

As árvores filogenéticas foram estimadas no TREEFINDER (Jobb, 2008) por meio de Máxima Verossimilhança, que procura inferir a história evolutiva de um grupo que é mais consistente com as sequências de nucleotídeos observadas (Swofford & Olsen, 1996). Contudo, para aplicação desse método deve ser especificado um modelo de evolução que expresse como converter uma sequência em outra. O modelo evolutivo que melhor se adequava a cada um dos marcadores foi estimado no MODELTEST 3.6 (Posada & Crandall, 1998), que compara modelos progressivamente mais complexos, com correções para sítios invariantes e heterogeneidade de taxas. O critério para escolha do modelo foi o AIC (Critério de Informação Akaike; Akaike, 1974), que calcula a expectativa do log-verossimilhança para um novo conjunto de dados de mesmo tamanho do original, e compara múltiplos modelos que não são necessariamente hierarquizados (Felsenstein, 2004; Yang, 2006). As árvores estimadas foram visualizadas e editadas no programa FIGTREE v.1.2.2 (Rambaut, 2009). As relações genealógicas entre os haplótipos também foram estimadas por redes haplotípicas do tipo *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999), calculadas no NETWORK 4.5.0.1 (Fluxus Technology Ltd.).

A polaridade das árvores filogenéticas foi determinada por comparação com grupo externo (Nixon & Carpenter, 1993), usando-se sequências homólogas de *Zungaro spp* e *Brachyplatystoma spp*. O suporte estatístico para os nós das filogenias foi avaliado por análise de reamostragem do tipo *Bootstrap* (1000 pseudo-réplicas), um método popular para estimar a confiança da inferência de relações evolutivas (Felsenstein, 1985). Na reamostragem, *n* sítios nucleotídicos do alinhamento original são escolhidos ao acaso e com reposição (pseudo-réplicas), de modo a formar novos alinhamentos com o mesmo *n* original (Nei & Kumar, 2000). A partir desses alinhamentos são reconstruídas novas árvores, que são resumidas em uma árvore de consenso (*majority rule*). O valor do *Bootstrap* para cada nó dessa árvore significa a porcentagem de árvores na qual ele foi recuperado durante o procedimento de reamostragem. Clados cujos valores de *Bootstrap* são iguais ou superiores a 90-95% são considerados significativamente sustentados, independentemente da repetibilidade (Hall, 2001). Valores moderados (70-89%) ou fracos (51-69%), se repetidos em vários marcadores diferentes, são considerados como indicativos de suporte (Schneider, 2003). De Queiroz (1993) considera árvores significativamente incongruentes aquelas cujos nós conflituosos tenham probabilidades posteriores Bayesianas maiores do que 95% e valores de *Bootstrap* maiores que 80%. Incongruências entre as topologias foram acessadas pelos seguintes testes, comparados às árvores não restringidas mais prováveis após 1.000.000 de réplicas, e enraizadas com *P. magdaleniatum/Zungaro*: Probabilidade de *Bootstrap* (BP, (Felsenstein, 1985), *Expected-Likelihood Weights* (ELW, Strimmer & Rambaut, 2002), Teste de Kishino e Hasegawa (KH, Kishino & Hasegawa, 1989), Teste de Shimodaira e Hasegawa (SH, Shimodaira & Hasegawa, 1999), *Weighted SH* (WSH, Shimodaira & Hasegawa, 1999) e o Teste *Approximately Unbiased* (AU, Shimodaira,

2002). Todos estão presentes no TREEFINDER e usam a técnica RELL (Kishino *et al.*, 1990) para evitar a reestimação dos parâmetros em seus *Bootstrap* não paramétricos.

Neste trabalho, testou-se a hipótese de que espécies definidas morfológicamente mostram-se como clados monofiléticos de haplótipos mitocondriais e nucleares, como preconizado pelo Conceito Filogenético de Espécie. Com base nos padrões de ramificação dos cladogramas, investigou-se a biogeografia histórica do gênero *Pseudoplatystoma* na América do Sul, de modo a compreender a relação entre as mudanças na matriz geográfica do continente e a diversificação do táxon. Se eventos vicariantes são a causa predominante da divergência em *Pseudoplatystoma*, então as linhagens irmãs deveriam estar distribuídas alopatricamente mais frequentemente. Grupos de haplótipos reciprocamente monofiléticos em bacias separadas indicariam um longo tempo de isolamento entre essas linhagens, enquanto aquelas linhagens parafiléticas e polifiléticas poderiam sugerir fluxo gênico recente ou polimorfismo ancestral. Na análise dos padrões vicariantes que podem ter influenciado a especiação em *Pseudoplatystoma*, considerou-se as barreiras contemporâneas e paleogeográficas que poderiam ter atuado no isolamento dessas linhagens. A influência da dispersão foi tratada como hipótese alternativa para a diversificação do grupo.

### **3.4-Estimativa dos tempos de divergência dos clados**

A datação dos nós internos das filogenias foi feito no pacote BEAST v.1.4.8 (Drummond & Rambaut, 2007), um conjunto de programas para análise Bayesiana por Metropolis-Hastings MCMC (Cadeias de Markov Monte Carlo) (Metropolis *et al.*, 1953; Hastings, 1970). O MCMC é um algoritmo estocástico que produz estimativas baseadas em amostragens de uma distribuição alvo de interesse, neste caso a

distribuição posterior de uma série de parâmetros evolutivos, dado um alinhamento de sequências moleculares (Drummond & Rambaut, 2009). Neste pacote, as estimativas de taxas de substituição e de tempos de divergência podem ser feitas usando-se modelos de relógio molecular relaxado, um dos avanços recentes mais promissores no ramo da filogenética molecular, na medida em que não assumem uma improvável taxa de mudança constante entre as linhagens (Sanderson, 2002; Thorne & Kishino, 2002). O programa BEAUTI v.1.4.8 (Drummond & Rambaut, 2007) foi empregado para gerar arquivos de entrada para o Citocromo b e para as sequências concatenadas dos íntrons.

Diferentes partições foram consideradas para o gene codificador de proteína (Citb), de maneira que incorporasse a heterogeneidade de taxa entre as posições do códon. Utilizou-se uma distribuição Gamma associada a um modelo de sítios invariáveis para modelar essa heterogeneidade, permitindo ao alinhamento conter tanto regiões com diferentes taxas evolutivas (mais rápidas e mais lentas), como também sítios que nunca variam (enquanto o resto evolui à mesma taxa). Altos valores para o parâmetro alfa da distribuição Gamma, que determina a variação da taxa entre os sítios, indicam pouca variação; alfa menor do que 1,0 (um) indica grande variação na taxa de substituição entre os sítios, ou seja, poucos são os sítios com altas taxas de substituição (em geral terceira posição do códon), enquanto a maioria é invariável (Drummond *et al.*, 2007).

Foram selecionadas quatro categorias para aproximação discreta da distribuição Gamma. O modelo SRD06 (Shapiro *et al.*, 2006) foi usado para permitir que o próprio BEAUTI selecionasse uma combinação particular dos códons para formar as partições. Dessa forma, as partições para o Citb foram (1+2)+3, ou seja, pondo-se as duas primeiras posições em uma partição (menor taxa evolutiva devido à restrições seletivas) e a terceira posição em uma partição separada (taxa mais elevada devido a maior

redundância do código genético nessa posição). Tem sido demonstrado que este modelo fornece uma adequação melhor para regiões codificadoras de proteínas (Drummond *et al.*, 2007). Para os locos nucleares também foi assumida heterogeneidade de taxa com alguma proporção de sítios invariantes, mas sem a necessidade de partições, dada sua condição de DNA não codificante.

Para as estimativas dos tempos de divergência, foi empregado um modelo de relógio relaxado lognormal não-correlacionado (uclD), que estima a taxa de substituição para cada nó a partir de uma distribuição lognormal e o tACMR (tempo ao ancestral comum mais recente) dos clados (Drummond *et al.*, 2006). Com este modelo, pode-se ter uma indicação da adequação dos dados ao modelo de relógio molecular estrito. Quando seu desvio padrão for zero, significa que não há variação de taxa entre os ramos, do contrário ( $>1$ ) há heterogeneidade substancial entre linhagens, ou seja, o desvio padrão nas taxas dos ramos é maior do que a taxa média (Drummond & Rambaut, 2009). Além disso, se o histograma de frequências do coeficiente de variação estiver mais próximo a zero, há um indício de homogeneidade de taxa entre os ramos (Drummond *et al.*, 2007).

A taxa média de substituição foi estimada e usada pelo programa para calcular as idades médias (com intervalos de confiança) dos clados. A calibração do relógio foi feita colocando-se um *prior* para o tACMR do gênero *Pseudoplatystoma* (distribuição normal centrada em 12 milhões de anos com desvio padrão de 0,5 milhões de anos), com base no registro geológico da separação entre a bacia do Magdalena e o paleo Amazonas-Orinoco (12 **ma**), que corresponderia à divisão entre *P. magdaleniatum* e as demais espécies. Este *prior* foi usado no cálculo das estimativas das distribuições posteriores dos tempos de divergência dos outros nós. Para a árvore, foi estabelecido o *prior* de Yule, um modelo simples de especiação mais apropriado quando se considera

sequências de diferentes espécies, assumindo uma taxa de especiação constante por linhagem.

Cada parâmetro do modelo tem um ou mais operadores que determinam como o MCMC propõe novos estados para mover-se, de tal forma que uma configuração apropriada permite a passagem para a fase estacionária mais rapidamente e uma amostragem mais eficiente da distribuição alvo (Drummond *et al.*, 2007). Estabeleceu-se a opção de auto-otimização que ajusta automaticamente os parâmetros dos operadores à medida que as cadeias Markovianas estejam rodando. Estabeleceu-se, por análise exploratória, 30.000.000 de gerações (número de passos que o algoritmo fará na cadeia antes de finalizar a análise.), com um *burning* de 300.000, ou seja, os resultados das 300.000 primeiras gerações foram descartados. A cada 3.000 gerações foram feitas as amostragens na distribuição de probabilidades posteriores dos parâmetros (10.000 amostras).

O programa TRACER v.1.4.1 (Rambaut & Drummond, 2007) foi utilizado para sumarizar graficamente e quantitativamente a distribuição dos parâmetros estimados, suas respectivas médias, erro padrão, intervalo de confiança (95%) e o Tamanho Amostral Efetivo (TAE). O TAE é uma medida da eficiência das estimativas feitas por meio do MCMC, onde valores satisfatórios são aqueles acima de 200, pois indicam uma grande proporção de amostras não correlacionadas que pode estar representando bem a distribuição de probabilidades posteriores de cada parâmetro (Drummond *et al.*, 2007).

BEAST também amostra árvores Bayesianas, cujas informações são resumidas em uma árvore de consenso (*majority rule*) calculada no TREEANNOTATOR v.1.4.8 (Drummond & Rambaut, 2007). Foram eliminadas as 3.000 primeiras árvores (*burnin*) das 10.000 amostradas. Sobre a árvore de consenso foram anotadas as idades médias dos nós e seus intervalos de confiança. O suporte para os clados foi estimado por suas

probabilidades posteriores, uma medida da frequência com que um determinado clado aparece nas árvores visitadas pelo algoritmo. Esta árvore foi visualizada e editada no programa FIGTREE v.1.2.2.

## 4-RESULTADOS

### 4.1-Sistemática Molecular de *Pseudoplatystoma*

Foram obtidas 818 pb (121 sítios variáveis) do gene mitocondrial do Citocromo b para 245 indivíduos de *Pseudoplatystoma* (59 haplótipos; Genbank: GU593097-GU593157). O número total de substituições foi de 131 (116 mudanças sinônimas), sendo que em apenas dois casos de substituição não-sinônima houve troca de aminoácidos apolares por polares. O número médio de diferenças nucleotídicas (k) entre essas sequências foi de 25,3, ou seja, em média, os haplótipos diferem em 25 posições nucleotídicas entre si. Os testes de neutralidade ( $D^*$  de Fu & Li: 1,29365,  $P > 0,10$ ;  $F^*$  de Fu & Li: 1,29365,  $P > 0,10$ ; e  $D$  de Tajima: 1,29365,  $P > 0,10$ ) não foram capazes de rejeitar a hipótese nula de neutralidade seletiva.

Em relação ao primeiro íntron do gene Rag1, obteve-se 664 pb (58 sítios polimórficos) para 228 indivíduos (43 haplótipos; Genbank: GU593198-GU593242), dos quais 72 eram heterozigotos (24 estimados no PHASE). O número médio de diferenças nucleotídicas (k) foi igual a 7,2. Nenhum dos testes de neutralidade ( $F^*$  de Fu & Li= 1,07503,  $P > 0,10$ ;  $D$  de Tajima= -0,11878,  $P > 0,10$ ), exceto o  $D^*$  de Fu & Li (1,69581,  $P < 0,05$ ), foi significativo estatisticamente. Três indels foram observados no alinhamento: uma deleção de 15 pb (ausente no grupo externo) presente em todas as amostras de *P. punctifer*, na maior parte das amostras de *P. reticulatum*, em *P. fasciatum* e em algumas amostras de *P. orinocoense*; uma deleção de 12 pb em duas amostras de *P. metaense*; e uma deleção de 12 pb em um indivíduo de *P. corruscans* do São Francisco.

Um total de 635 pb do primeiro íntron do gene ribossomal S7 foram analisados (49 sítios variáveis) para 122 indivíduos (39 haplótipos; Genbank: GU593158-GU593197), dos quais 72 eram heterozigotos (26 estimados no PHASE). O número médio de diferenças nucleotídicas (k) foi de 6,7. Os testes de neutralidade não mostraram valores de p significativos ( $F^*$  de Fu & Li = -0,04091,  $P > 0,10$ ;  $D^*$  de Fu & Li = 0,39149,  $P > 0,10$ ;  $D$  de Tajima = -0,58284,  $P > 0,10$ ). Dois diferentes indels foram observados: uma deleção de 2 pb presente em *P. corruscans*, *P. magdaleniatum* e *P. metaense*; e uma deleção de 4 pb (que parece ter relação com a primeira, pois os dois primeiros sítios parecem ser homólogos com a deleção de 2 pb) encontrada apenas em *P. tigrinum*. Nenhum sinal de recombinação foi detectado para os marcadores nucleares após análises feitas no programa RDP (dados não apresentados).

As distâncias genéticas (distância-*p*) pareadas entre as espécies e dentro das espécies estão na Tabela 3. Em geral, os menores valores foram observados para o Rag1int1. *Pseudoplatystoma magdaleniatum* e *P. corruscans* apresentaram os maiores valores quando comparados às outras espécies (5-6% em divergência de sequência). Na comparação *P. tigrinum* x *P. metaense* (consideradas uma única espécie antes da revisão taxonômica do gênero), os valores foram menores do que 0,3%. *Pseudoplatystoma reticulatum* diverge fracamente de *P. punctifer* (0,6-0,8%) e *P. fasciatum* (0,5-0,7%). As distâncias-*p* de *P. fasciatum* variaram de 0,4-0,8% em relação à *P. punctifer*. *Pseudoplatystoma orinocoense* mostrou alta divergência em sequência no Citb (2-2,3%) em relação a *P. punctifer*, *P. fasciatum* e *P. reticulatum*, e entre 2,1 to 3,3% de sua espécie simpátrica no Orinoco (*P. metaense*).

*Pseudoplatystoma* apresenta, de acordo com o Citocromo b, clados monofiléticos referentes à *P. magdaleniatum*, *P. corruscans*, *P. tigrinum*+*P. metaense* (definido como clado *P. tigrinum*), *P. orinocoense*, *P. reticulatum*+*P. fasciatum*+*P.*

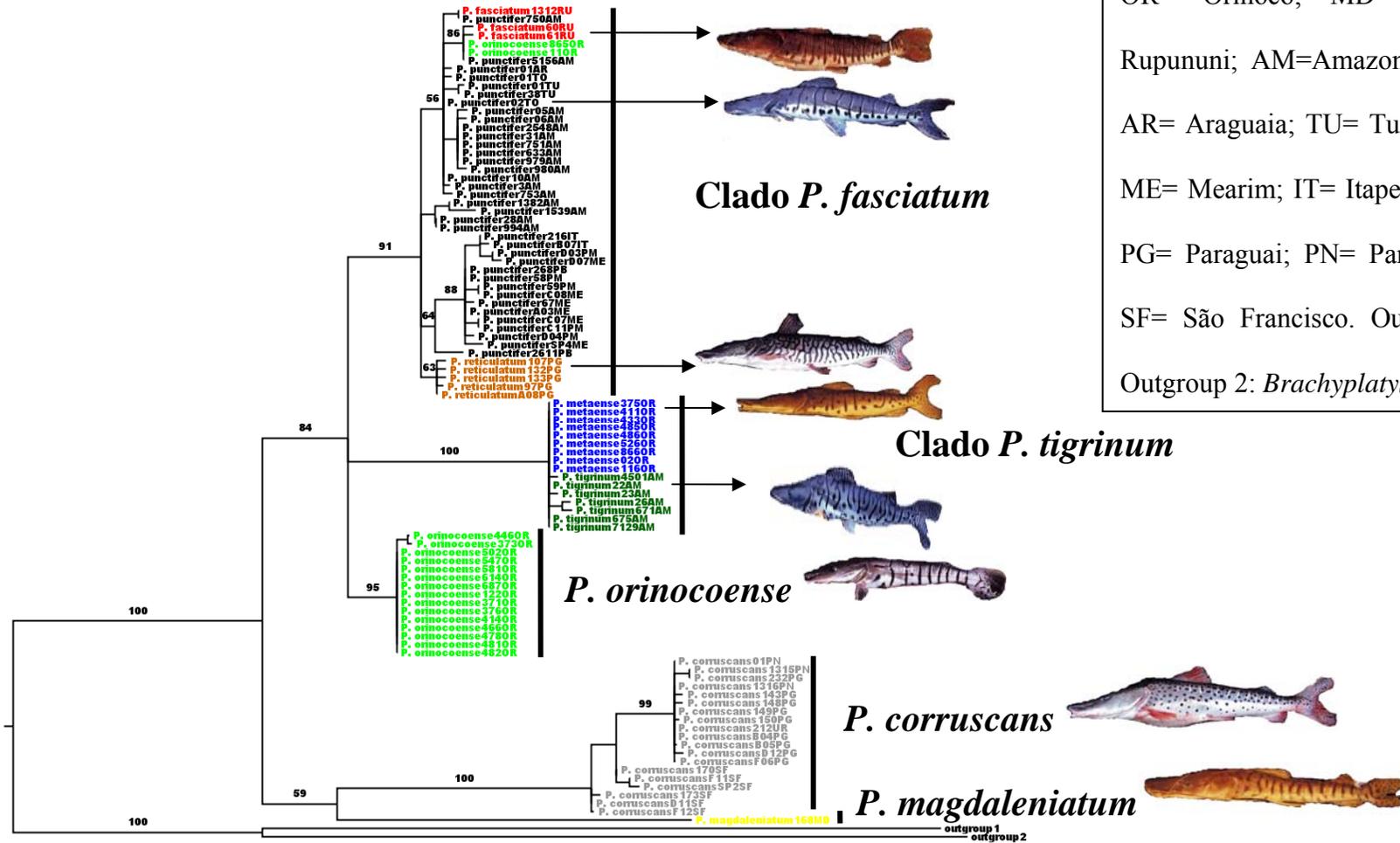
*punctifer* (definido como clado *P. fasciatum*) (Figura 7). *Pseudoplatystoma magdaleniatum* e *P. corruscans* seriam os grupos mais basais, mas as relações entre *P. orinocoense*, o clado *P. tigrinum* e o clado *P. fasciatum* não estão bem resolvidas neste marcador.

As árvores nucleares foram capazes de distinguir grupos monofiléticos para *P. magdaleniatum*, *P. corruscans* e o clado *P. tigrinum* (este apenas no S7int1) (Figuras 8 e 9). No íntron do Rag1, o clado *P. tigrinum* apresentou dois cladogramas diferentes, mas altamente apoiados: um com amostras do Amazonas e Orinoco e o outro apenas com peixes do Orinoco (Figura 8). Estes dois cladogramas diferem em 2,9% e possuem muitas mutações fixadas, além da deleção de 12 pb citada anteriormente. Quando os dois íntrons são concatenados, há uma sensível melhora na resolução das relações evolutivas (Figura 10). Nesta árvore, são vistos grupos monofiléticos altamente sustentados para *P. magdaleniatum*, clado *P. tigrinum*, *P. corruscans* e um grupo de suporte moderado composto por clado *P. fasciatum* + *P. orinocoense*. *Pseudoplatystoma magdaleniatum* ocupa, sozinho, a região mais basal da filogenia, enquanto o clado *P. tigrinum* é grupo-irmão de clado *P. fasciatum* + *P. orinocoense* + *P. corruscans*. Essa incongruência entre as relações de *P. corruscans* e o clado *P. tigrinum* com os demais cladogramas foi avaliada por testes de topologia, que não mostraram diferenças significativas quando *P. corruscans* é colocado como grupo-irmão de clado *P. fasciatum* + *P. orinocoense* no Citb, ou quando é colocado no ramo ocupado por clado *P. tigrinum* nas genealogias nucleares (Tabela 4).

**Tabela 3:** Distâncias-*p* não corrigidas para o gene do Citocromo b (primeiro valor) e para os marcadores nucleares: Rag1int1 (segundo valor) e S7int1 (terceiro valor). mag: *P. magdaleniatum*, cor= *P. corruscans*, ori: *P. orinocoense*, tig: *P. tigrinum*, met: *P. metaense*, ret: *P. reticulatum*, pun: *P. punctifer*, fas: *P. fasciatum*.

	<b>pun</b> (0,007/0,005/0,005)	<b>ret</b> (0,002/0,006/0,005)	<b>fas</b> (0/0,008/0,005)	<b>cor</b> (0,009/0,003/0,003)	<b>ori</b> (0,002/0,003/0,002)	<b>met</b> (0/0,003/0,0019)	<b>tig</b> (0,003/0,002/0,003)
<b>ret</b>	0,008/0,006/0,006						
<b>fas</b>	0,008/0,006/0,004	0,007/0,005/0,005					
<b>cor</b>	0,057/0,012/0,014	0,056/0,013/0,015	0,052/0,012/0,013				
<b>ori</b>	0,022/0,008/0,011	0,020/0,007/0,010	0,023/0,005/0,010	0,053/0,014/0,015			
<b>met</b>	0,036/0,018/0,024	0,036/0,019/0,023	0,032/0,019/0,023	0,061/0,017/0,027	0,033/0,021/0,025		
<b>tig</b>	0,038/0,019/0,025	0,038/0,020/0,025	0,034/0,019/0,024	0,063/0,017/0,028	0,035/0,021/0,026	0,002/0,003/0,002	
<b>mag</b> (0/0,002/0,002)	0,061/0,027/0,019	0,057/0,027/0,020	0,056/0,027/0,018	0,067/0,025/0,020	0,059/0,029/0,020	0,067/0,019/0,026	0,069/0,019/0,027

Cytb (HKY+G)



OR= Orinoco; MD= Magdalena; RU= Rupununi; AM= Amazonas; TO= Tocantins; AR= Araguaia; TU= Turiaçu; PM= Pindaré; ME= Mearim; IT= Itapecuru; PB= Parnaíba; PG= Paraguai; PN= Paraná; UR= Uruguai; SF= São Francisco. Outgroup 1: *Zungaro*, Outgroup 2: *Brachyplatystoma*.

Figura 7: Árvore de Máxima Verossimilhança para as relações evolutivas, estimadas pelo Citocromo b, das espécies de *Pseudoplatystoma*.

Rag1int1 (HKY+G)

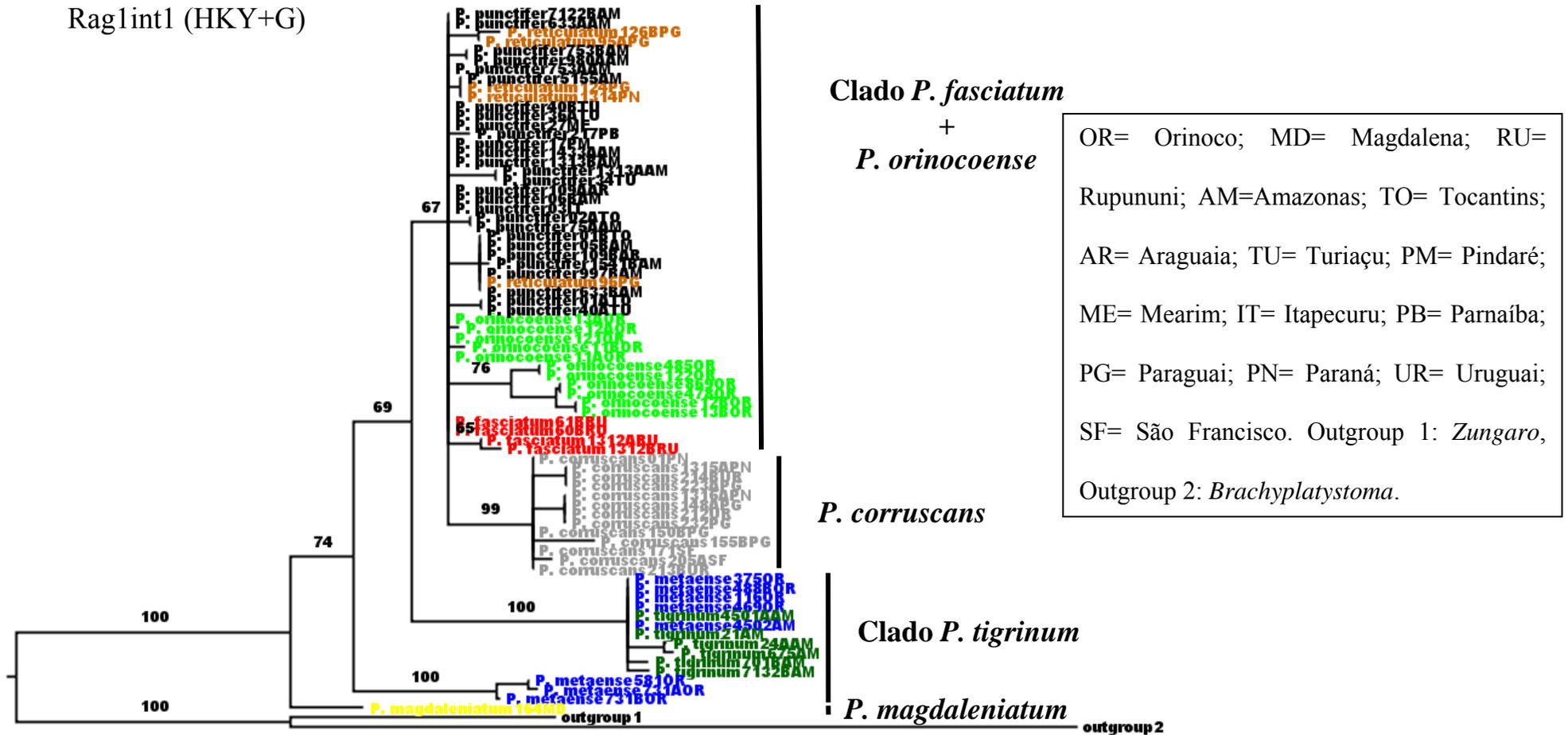
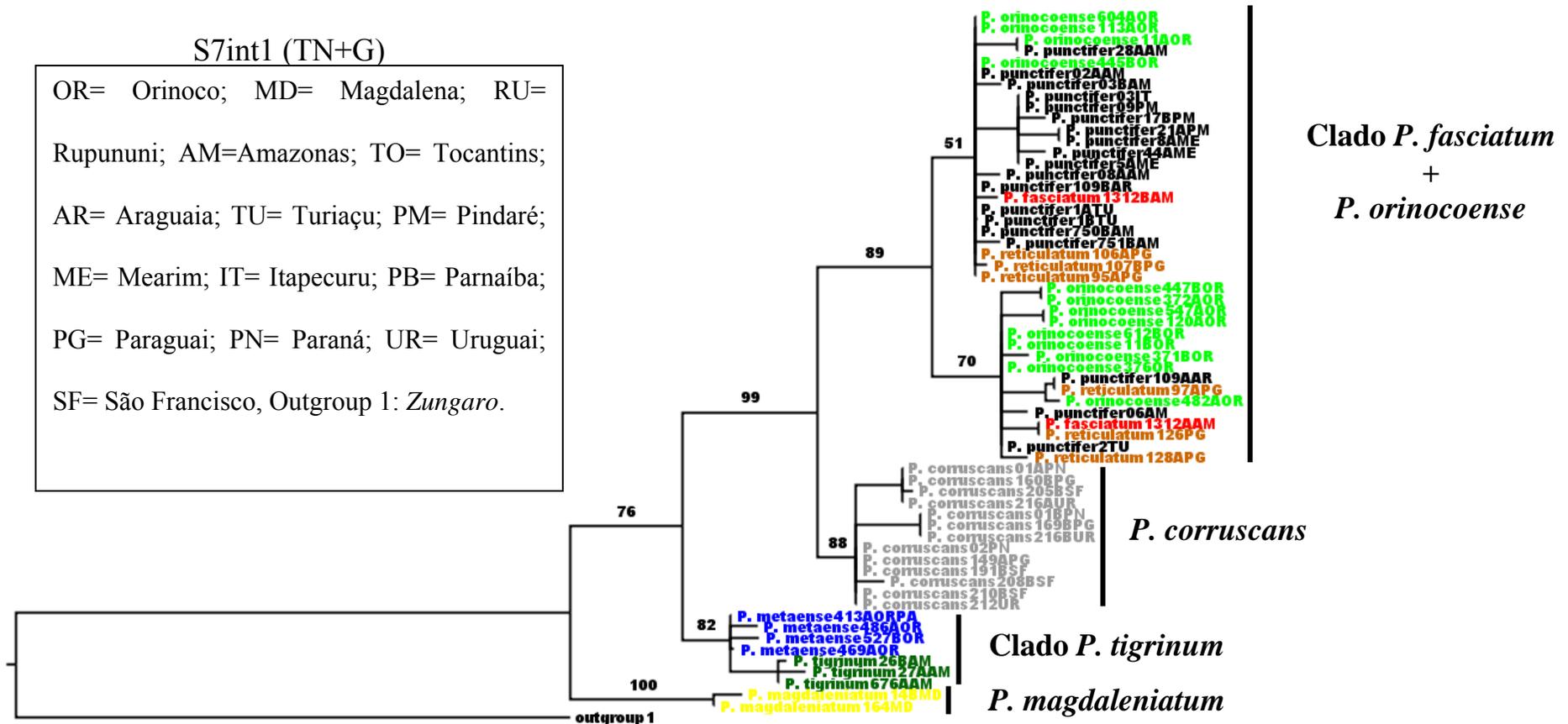
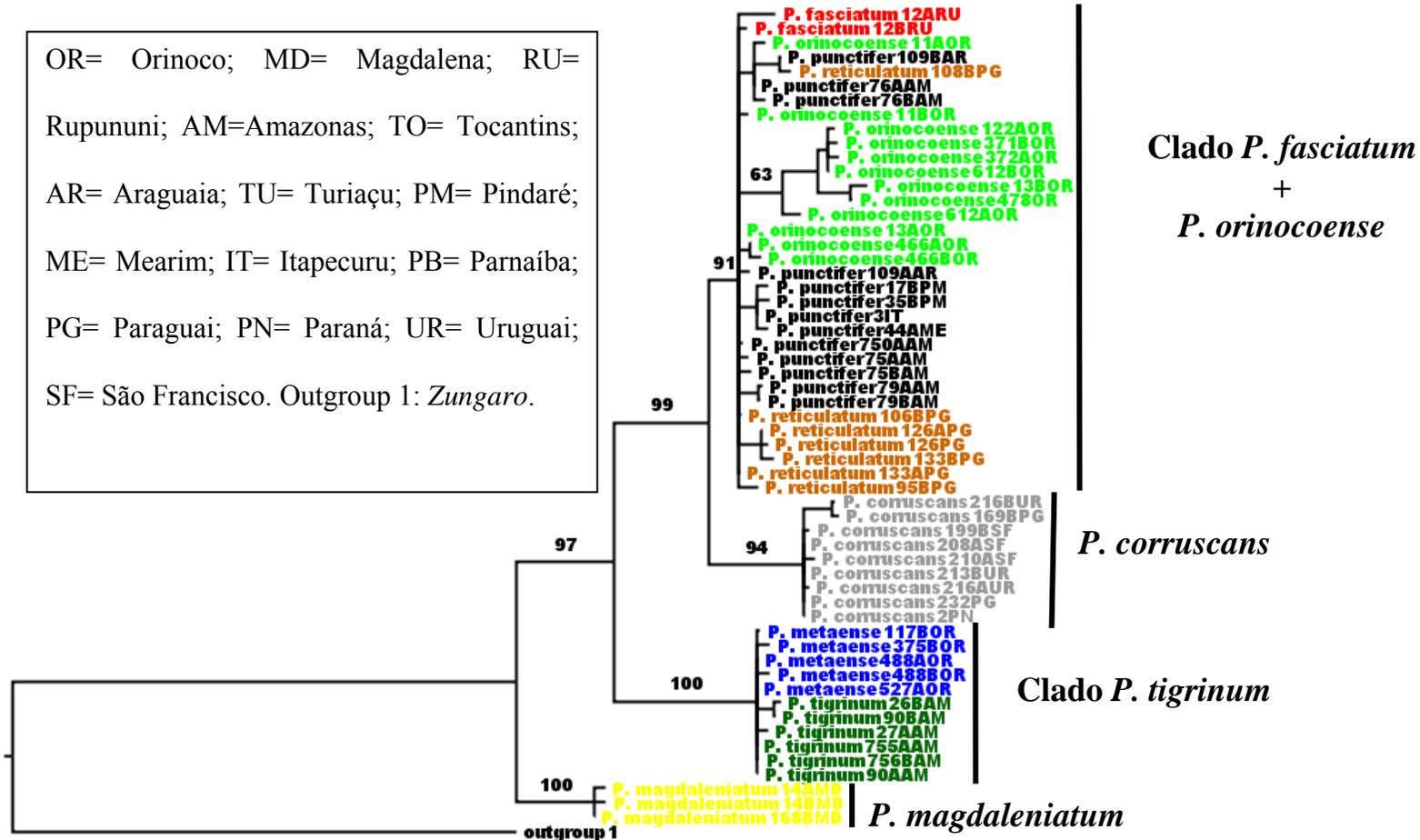


Figura 8: Árvore de Máxima Verossimilhança para as relações evolutivas, estimadas pelo Rag1int1, das espécies de *Pseudoplatystoma*.



**Figura 9:** Árvore de Máxima Verossimilhança para as relações evolutivas, estimadas pelo S7int1, das espécies de *Pseudoplatystoma*.

Rag1int1+S7int1 (HKY+G)



**Figura 10:** Árvore de Máxima Verossimilhança para as relações evolutivas, estimadas pelo locos nucleares concatenados, das espécies de *Pseudoplatystoma*.

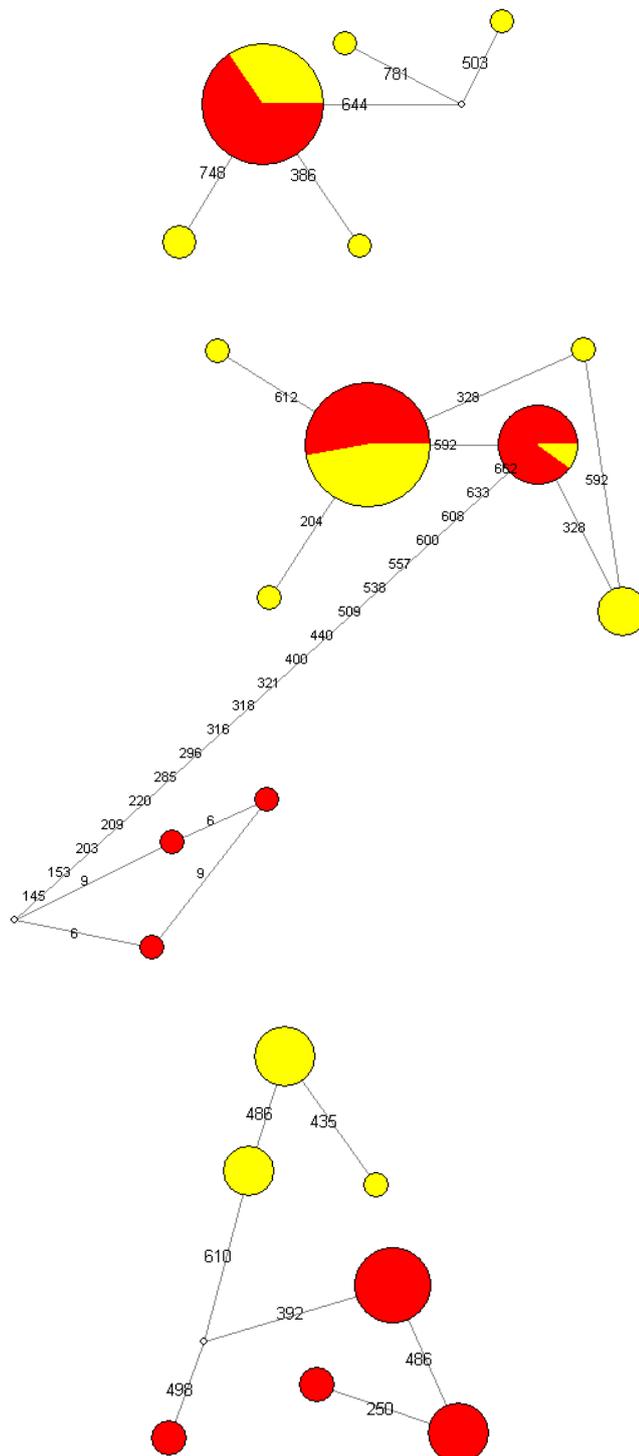
**Tabela 4:** Teste de sítios pareados (BP= Probabilidade Bootstrap; ELW= Expected-Likelihood Weights; KH= teste de Kishino & Hasegawa; SH= Teste de Shimodaira & Hasegawa test; WSH= Weighted SH; AU= teste Approximately Unbiased) usados para avaliar topologias alternativas quanto às relações evolutivas de *P. corruscans* e o clado *P. tigrinum* com as outras espécies. Zun= *Zungaro*, mag= *P. magdaleniatum*, cor= *P. corruscans*, tig= clado *P. tigrinum*, fas= *P. fasciatum*, pun= *P. punctifer*, ret= *P. reticulatum*, ori= *P. orinocoense*.

Marcador	Histórias alternativas	Valores de p					
		ELW	BP	KH	SH	WSH	AU
<b>Citb</b>	((Zun,mag),tig),((fas,pun),ret),ori,cor))	0,92	0,93	1	1	1	0,96
<b>S7int1</b>	(cor (outros)) :	0,97	0,98	1	1	1	0,99
<b>Rag1int1</b>	((Zun,mag),cor),tig,((fas,pun),ori,ret));	0,65	0,65	1	1	1	0,92

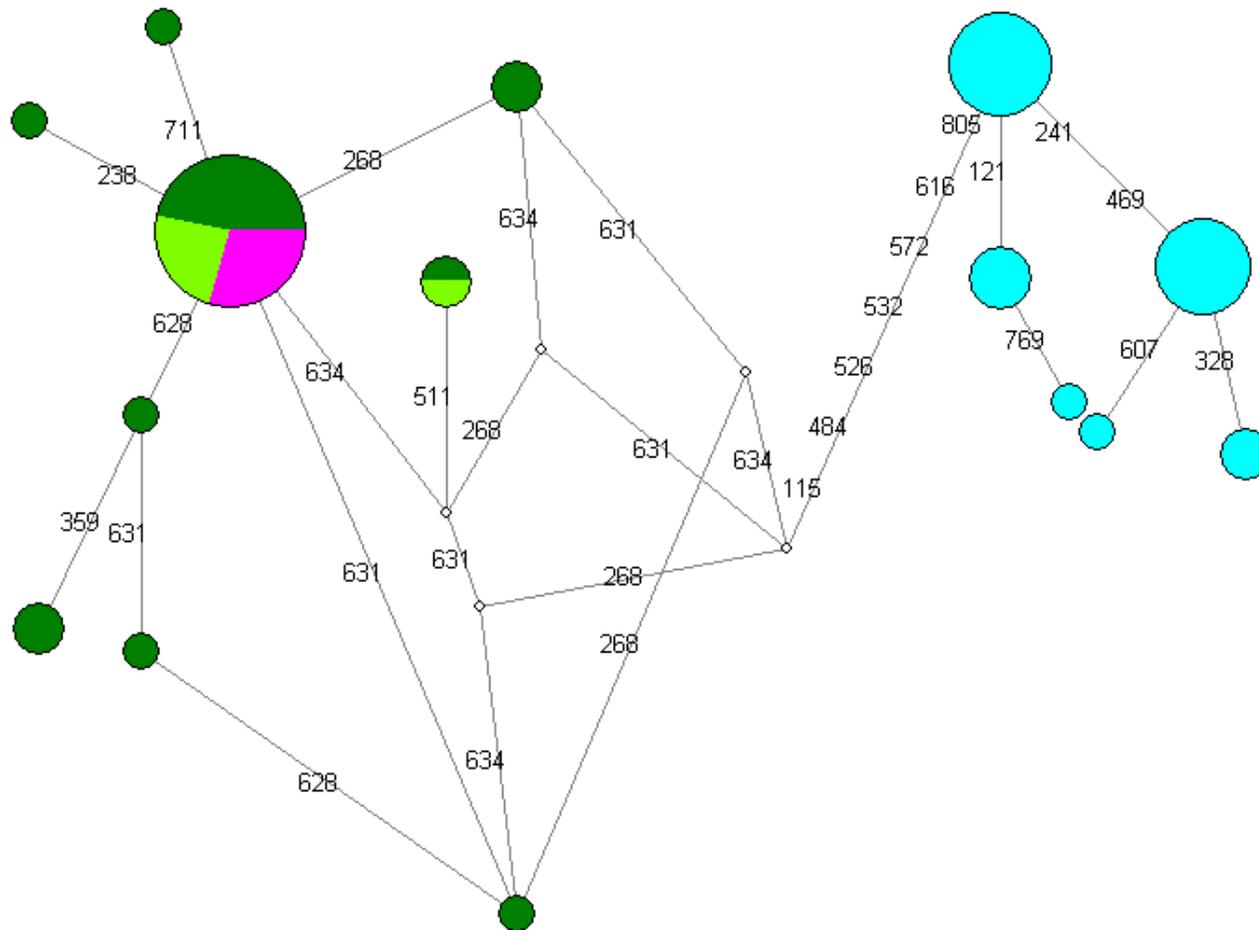
No clado *P. tigrinum* foram encontrados haplótipos compartilhados entre peixes das bacias do Amazonas e Orinoco no Citb e no íntron do Rag1 (Figura 11). Contudo, também houve haplótipos exclusivos no Amazonas (Citb) e Orinoco (Citb e Rag1int1). Não houve haplótipos de S7int1 encontrados em ambas as bacias. Foram encontradas diferenças entre as populações de *P. corruscans* das bacias do São Francisco e Paraná-Paraguai-Uruguai (1,5% em divergência), que não têm haplótipos em comum no Citocromo b (Figura 12), o mesmo não ocorrendo para os locos nucleares (Figura 13). Dentro do sistema Paraná-Paraguai-Uruguai, observou-se extenso compartilhamento de haplótipos entre os peixes dos três rios.

No clado *P. fasciatum*, ocorreu a formação de um grupo, de suporte moderado no Citb, com as populações de *P. punctifer* de bacias hidrográficas do Maranhão (exceto

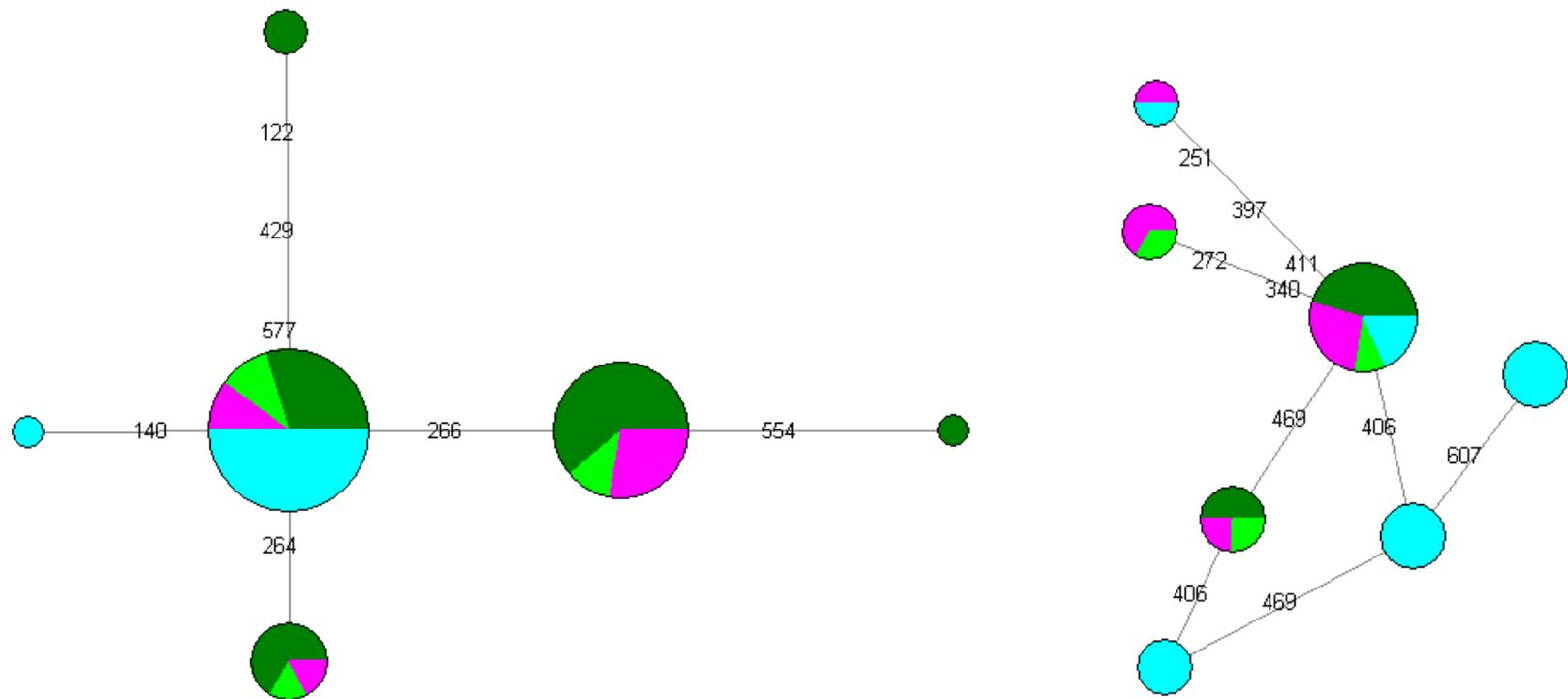
o Rio Turiaçu), 1% divergente em relação a *P. punctifer* do Amazonas (Figuras 7 e 14). No Rag1int1, há compartilhamento de haplótipos entre esses peixes e os demais do clado (exceto Parnaíba), enquanto no S7int1 há uma clara singularidade para os haplótipos desses rios (Figuras 15 e 16). O Rio Turiaçu apresentou, além de haplótipos exclusivos (Citb, Rag1int1, S7int1) pouco relacionados com os dos peixes dos outros rios do Maranhão (Mearim, Pindaré, Itapecuru e Parnaíba), haplótipos compartilhados com Amazonas (Rag1int1, S7int1), Tocantins (Rag1int1), Orinoco (Rag1int1, S7int1), Guianas (Rag1int1) e Paraguai (S7int1) (Figuras 14, 15 e 16). As amostras de *P. fasciatum* (*sensu* Buitrago Suárez & Burr, 2007) partilharam haplótipos no Citb (Amazonas) e no Rag1int1 (Maranhão, Amazonas, Orinoco, Araguaia e Xingú) com outros membros do clado (Figuras 14 e 15). Os espécimes de *P. orinocoense* tiveram o mesmo haplótipo de peixes do Amazonas (*P. punctifer*) no Citb, e a mesma deleção de 15 pb no Rag1int1 (além de algumas substituições) encontrada apenas em peixes do clado *P. fasciatum*. Um clado de suporte moderado também foi formado no Citocromo b para *P. reticulatum* (Figuras 7 e 14), diferindo pouco mais de 0,6% de *P. punctifer*. Nos outros marcadores houve amplo compartilhamento de haplótipos entre *P. reticulatum* e peixes do Amazonas (Rag1int1 e S7int1), Xingú (Rag1int1 e S7int1), Tocantins-Araguaia (Rag1int1 e S7int1), Turiaçu (S7int1) e Orinoco (S7int1) (Figuras 15 e 16). Quanto aos peixes do Amazonas (*P. punctifer*), não houve nenhuma tendência observável para a formação de clados dentro da bacia, a não ser no Xingú (Figura 14), que ainda sim compartilhou haplótipos com peixes de outras localidades do Amazonas no Rag1int1 (Figura 15). Os peixes do Amazonas também apresentaram haplótipos em comum com peixes do Tocantins (Citb, Rag1int1), Orinoco (Citb, Rag1int1, S7int1), Guianas (Citb, Rag1int1), Araguaia (Rag1int1, S7int1), Paraguai (Rag1int1, S7int1), Paraná (Rag1int1) e Turiaçu (S7int1) (Figuras 14, 15 e 16).



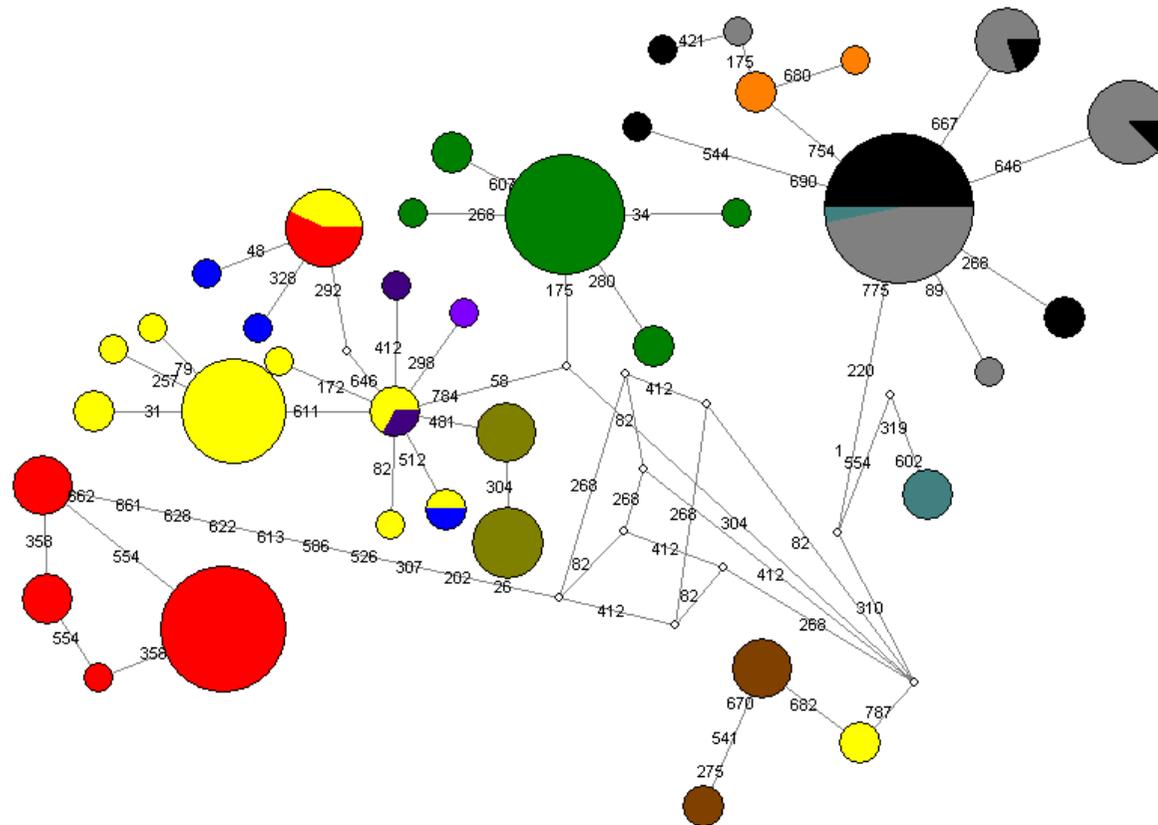
**Figura 11:** Rede de haplótipos (*median joining*) do Citocromo b (acima), Rag1int1 (meio) e S7int1 (abaixo) para o clado *P.tigrinum*. Amarelo: Amazonas; Vermelho: Orinoco; Branco: ancestrais hipotéticos. Números representam as posições que mudaram no alinhamento.



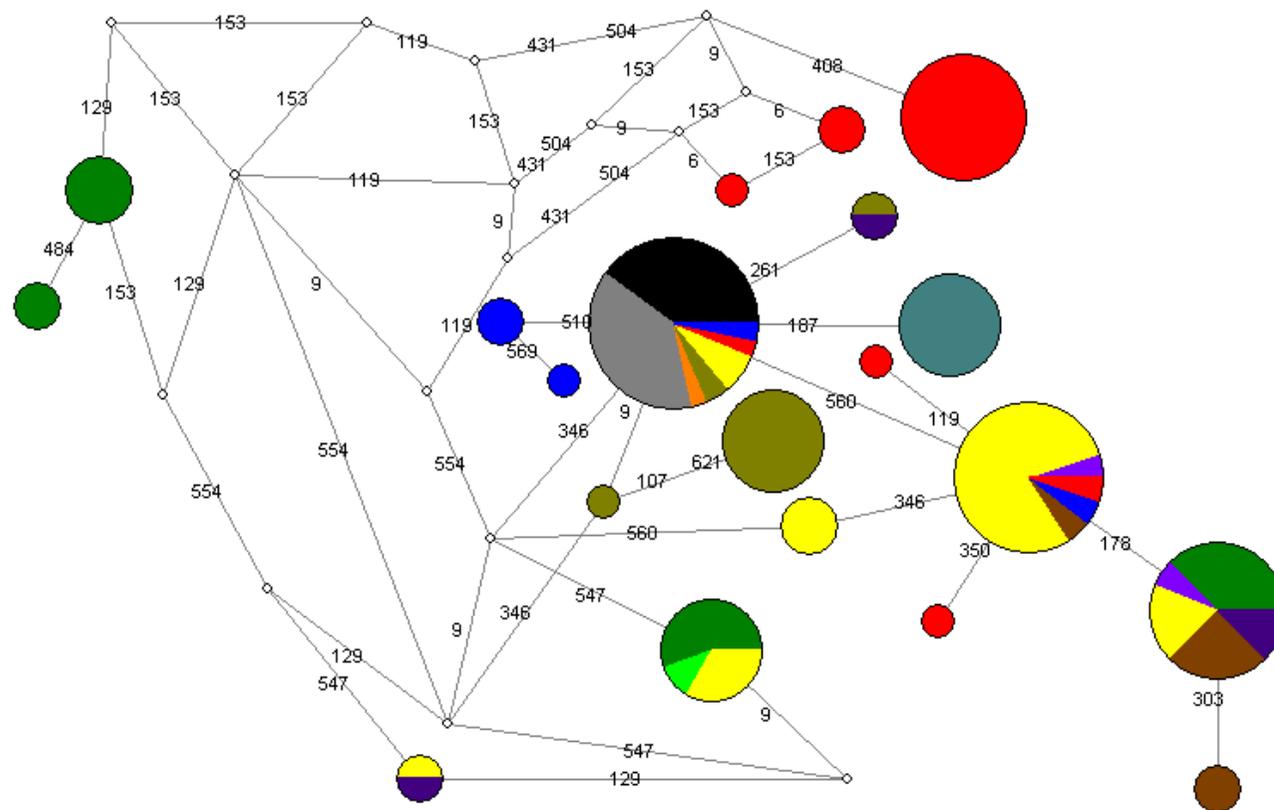
**Figura 12:** Rede de haplótipos (*median joining*) do Citocromo b para *P. corruscans*. Verde-escuro: Paraguai; Verde-claro: Paraná; Rosa: Uruguai; Azul-piscina: São Francisco; Branco: ancestrais hipotéticos. Números representam as posições que mudaram no alinhamento.



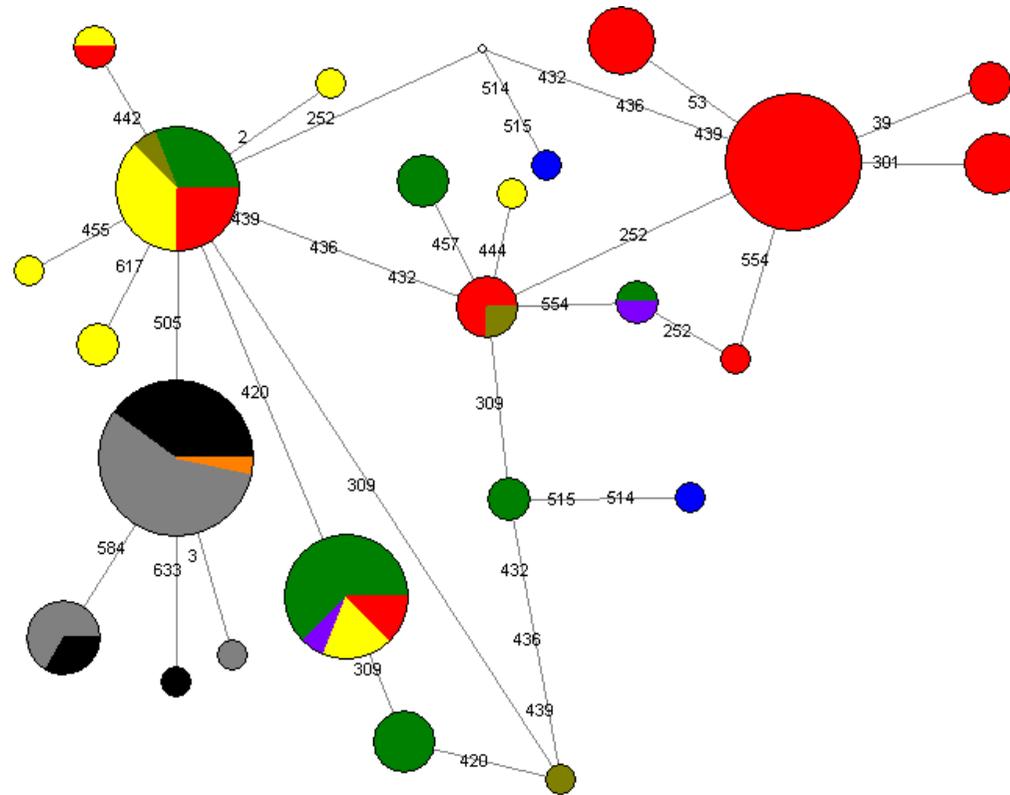
**Figura 13:** Rede de haplótipos (*median joining*) do Rag1int1 (esquerda) e S7int1 (direita) para *P. corruscans*. Verde-escuro: Paraguai; Verde-claro: Paraná; Rosa: Uruguai; Azul-piscina: São Francisco. Números representam as posições que mudaram no alinhamento.



**Figura 14:** Rede de haplótipos (*median joining*) do Citocromo b para o clado *P. fasciatum* + *P. orinocoense*. Amarelo: Amazonas; Marrom: Xingú; Vermelho: Orinoco, Verde-escuro: Paraguai; Azul-escuro: Guianas; Roxo-escuro: Tocantins; Lilás: Araguaia; Verde-musgo: Turiaçu; Preto: Mearim; Cinza-escuro: Pindaré; Bege: Itapecuru; Azul-petróleo: Parnaíba; Branco: ancestrais hipotéticos. Números representam as posições que mudaram no alinhamento.



**Figura 15:** Rede de haplótipos (*median joining*) do Rag1int1 para o clado *P. fasciatum* + *P. orinocoense*. Amarelo: Amazonas; Marrom: Xingú; Vermelho: Orinoco, Verde-escuro: Paraguai; Verde-claro: Paraná; Azul-escuro: Guianas; Roxo-escuro: Tocantins; Lilás: Araguaia; Verde-musgo: Turiaçu; Preto: Mearim; Cinza-escuro: Pindaré; Bege: Itaipuru; Azul-petróleo: Parnaíba; Branco: ancestrais hipotéticos. Números representam as posições que mudaram no alinhamento.



**Figura 16:** Rede de haplótipos (*median joining*) do S7int1 para o clado *P.fasciatum* + *P. orinocoense*. Amarelo: Amazonas; Marrom: Xingú; Vermelho: Orinoco, Verde-escuro: Paraguai; Azul-escuro: Guianas; Lilás: Araguaia; Verde-musgo: Turiaçu; Preto: Mearim; Cinza-escuro: Pindaré; Bege: Itapecuru; Branco: ancestrais hipotéticos. Números representam as posições que mudaram no alinhamento.

## 4.2-Datação dos eventos de cladogênese

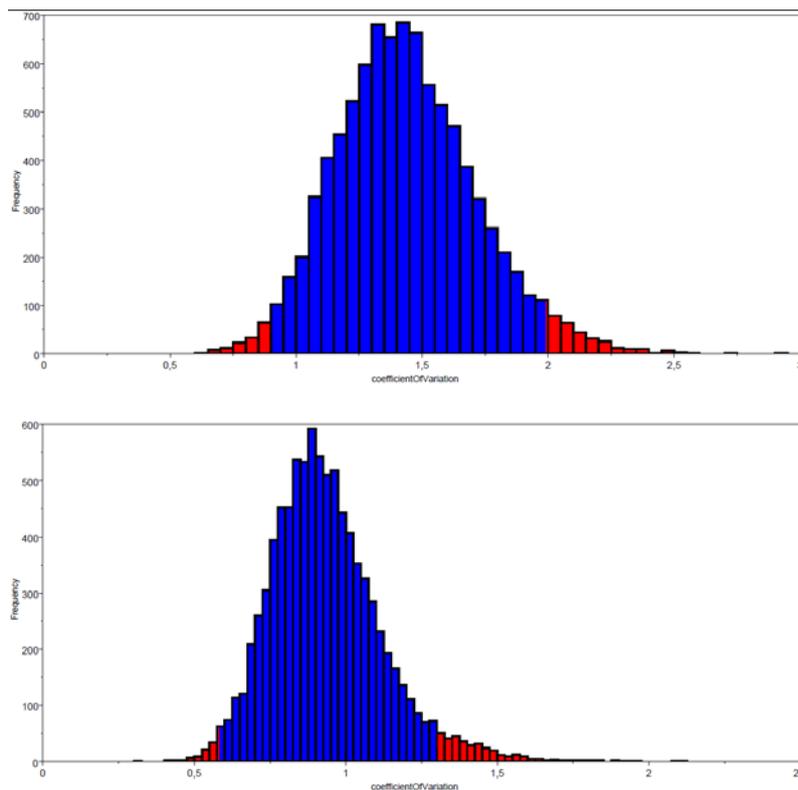
Todos os parâmetros estimados por BEAST apresentaram TAE superiores a 200. Quanto à rejeição antecipada da hipótese do relógio molecular estrito, os valores de desvio padrão para o modelo do relógio relaxado foram diferentes de zero, ou seja, as linhagens apresentaram heterogeneidade substancial nas taxas de substituição, especialmente no Citocromo b (Tabelas 5 e 6). Além disso, os coeficientes de variação do modelo deram a mesma indicação, na medida em que seus histogramas de frequência estavam afastados da origem do gráfico (Figura 17).

**Tabela 5:** Parâmetros estimados por BEAST usando o Citocromo b. Desvpad: Desvio Padrão; tACMR: Tempo ao ancestral comum mais recente; ucl: relógio relaxado; IC: Intervalo de confiança; TAE: Tamanho Amostral Efetivo.

	<b>Média</b>	<b>Desvpad</b>	<b>IC inf (95%)</b>	<b>IC sup (95%)</b>	<b>TAE</b>
<b>Taxa média de subst</b>	3,0405E-3	1,9673E-5	2,2411E-3	3,8913E-3	476,2337
<b>tACMR<sup>ÁRVORE</sup></b>	14,9702	0,1827	11,3844	20,2945	202,6819
<b>tACMR<sup>PSEUDO</sup></b>	11,9724	7,3275E-3	11,034	12,9123	4326,0557
<b>Alfa1 (1+2)</b>	49,105	0,3957	7,4206E-3	95,2706	5617,8486
<b>Alfa2 (3)</b>	4,5186	0,2878	0,4653	17,7587	1921,4853
<b>pInv1 (1+2)</b>	0,8345	1,6687E-3	0,7278	0,9237	1896,7275
<b>pInv1 (3)</b>	0,1209	1,543E-3	2,4775E-5	0,268	2795,4683
<b>Média ucl-</b>	1,9116E-3	1,0182E-5	1,3339E-3	2,5095E-3	923,4698
<b>Desvpad-ucl</b>	1,1332	4,6768E-3	0,8281	1,4546	1159,7404
<b>Coef. de variação</b>	1,4365	8,1682E-3	0,9005	1,9904	1160,848

**Tabela 6:** Parâmetros estimados por BEAST usando os dados nucleares. Desvpad: Desvio Padrão; tACMR: Tempo ao ancestral comum mais recente; uclid: relógio relaxado; IC: Intervalo de confiança; TAE: Tamanho Amostral Efetivo.

	Média	Desvpad	IC inf (95%)	IC sup (95%)	TAE
Taxa média de subst.	1,0612E-3	3,3362E-6	7,9416E-4	1,3335E-3	1751,548
tACMR <sup>ÁRVORE</sup>	14,0552	7,2617E-2	11,0095	18,4009	858,7175
tACMR <sup>PSEUDO</sup>	11,9057	5,5119E-3	10,9608	12,843	7627,5011
Alfa	43,3751	0,4582	1,1484E-2	94,0988	4526,3078
pInv	0,6906	2,4391E-3	0,5561	0,8036	1379,4423
Média-uclid-	8,4833E-4	4,1326E-6	6,1553E-4	1,1123E-3	990,6716
Desvpad-uclid	0,8184	5,964E-3	0,5718	1,0858	466,1999
Coef. de variação	0,9346	8,771E-3	0,5829	1,3006	442,728



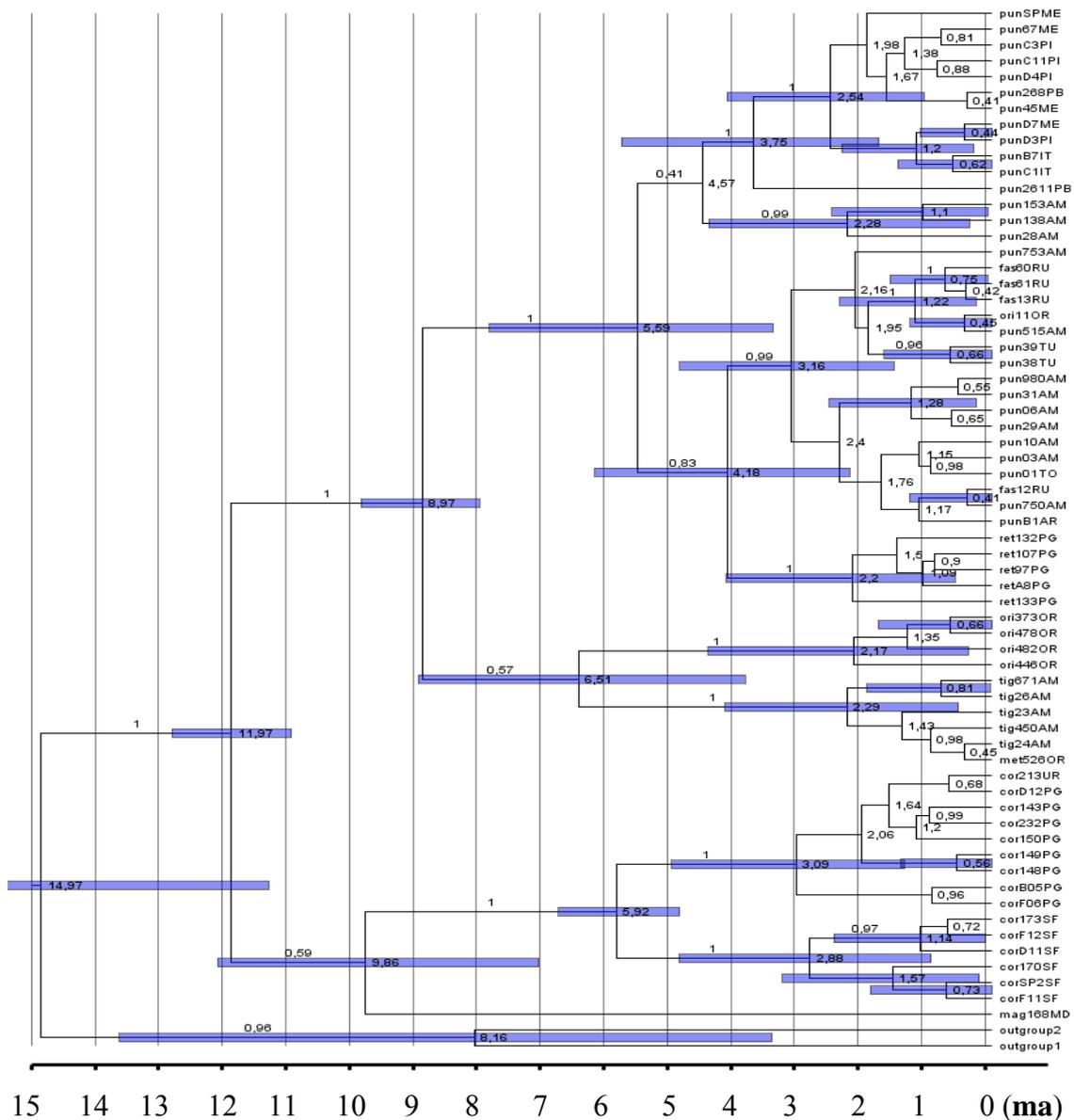
**Figura 17:** Histograma de frequências de amostras do coeficiente de variação do modelo de relógio relaxado. Citb: acima; Íntrons: abaixo.

Para as duas partições do Citb foram observados valores do parâmetro alfa superiores a 1,0 (um), com um valor maior para a primeira partição e menor para a segunda, demonstrando que há pouca heterogeneidade de taxa entre os sítios nucleotídicos. Nos íntrons, o valor estimado de alfa também foi alto (Tabelas 5 e 6).

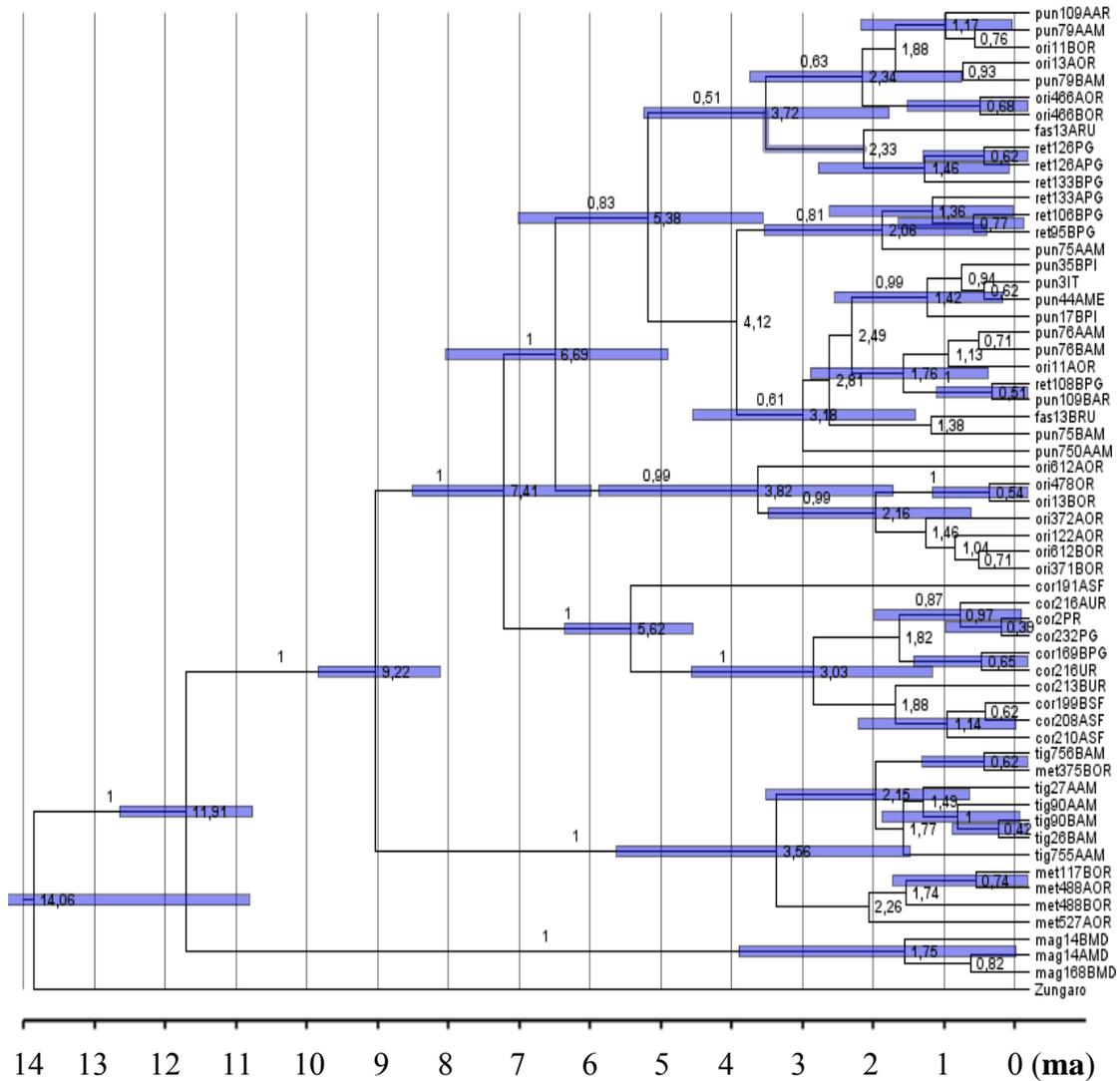
A taxa média de substituição por sítio por geração foi de 3,0405E-3 para o Citocromo b e de 1,0612E-3 para os íntrons (Tabelas 5 e 6). A calibração dos relógios moleculares do marcador mitocondrial e dos locos nucleares com o evento que marca a separação entre o Rio Magdalena e o Paleo Amazonas-Orinoco refletiu uma taxa de evolução de 0,53 % por milhão de anos para o Citocromo b e de 0,17% para os íntrons. A idade estimada da raiz da árvore foi datada em, aproximadamente, 14-15 milhões de anos, com intervalo de confiança (IC) de 11 a 20 milhões de anos. As amostras de *Pseudoplatystoma* têm um ancestral comum de 11,9 milhões de anos (IC: 10,9-12,9), de acordo as estimativas dos marcadores (Tabelas 5 e 6), que corresponde à primeira divisão do táxon. No Citocromo b, este evento não está claro, uma vez que nesta topologia a quebra basal do gênero pode ter dado origem, além de *P. magdaleniatum*, a *P. corruscans* (Figura 18). Nos locos nucleares, esse evento originou *P. magdaleniatum* e o ancestral dos demais grupos (Figura 19). O nó de clado *P. fasciatum* + *P. orinocoense* + clado *P. tigrinum* foi datado em 8,9 milhões de anos no Citb (IC: 8,0-9,9), a mesma idade da separação entre o Amazonas e o Orinoco. A datação feita a partir dos dados nucleares indica que o clado *P. tigrinum* separou-se do grupo que inclui clado *P. fasciatum* + *P. corruscans* há aproximadamente 9,2 **ma** (IC: 8,3-10).

Os dados nucleares apontam ainda um tempo de divergência de 7,4 milhões de anos (IC: 6,1-8,7) para a quebra entre clado *P. fasciatum* e *P. corruscans*. Também foi possível estimar, por meio do Citocromo b, o tempo de divergência para os peixes do clado *P. fasciatum* que ocupam os rios do Maranhão (3,7 **ma**; IC: 1,7-5,8) e Guianas

(0,748 **ma**; 0,078-1,6) (Figura 18). Além disso, o tempo de separação estimado entre as populações de *P. corruscans* do São Francisco e Paraná-Paraguai foi de 5,9 milhões de anos (IC: 4,9-6,8) (Figura 18). Ainda no Citocromo b, foi estimada uma idade de 4,2 **ma** para a separação *P. reticulatum* do restante dos membros do clado *P. fasciatum* (IC: 2-6) (Figura 18).



**Figura 18:** Árvore Bayesiana, inferida pelo Citocromo b, para as relações evolutivas das espécies de *Pseudoplatystoma* contendo a estimativa média e intervalo de confiança (95%, barra azul) para as idades (em milhões de anos) dos nós. mag: *P. magdaleniatum*, cor= *P. corruscans*, ori: *P. orinocoense*, tig: *P. tigrinum*, met: *P. metaense*, ret: *P. reticulatum*, pun: *P. punctifer*, fas: *P. fasciatum*. OR= Orinoco; MD= Magdalena; RU= Rupununni; AM= Amazonas; TO= Tocantins; AR= Araguaia; TU= Turiaçu; PI= Pindaré; ME= Mearim; IT= Itapecuru; PB= Parnaíba; PG= Paraguai; PN= Paraná; UR= Uruguai; SF= São Francisco. Outgroup 1: *Brachyplatystoma*, Outgroup 2: *Zungaro*.



**Figura 19:** Árvore Bayesiana, inferida pelos íntrons concatenados, para as relações evolutivas das espécies de *Pseudoplatystoma* contendo a estimativa média e intervalo de confiança (95%, barra azul) para as idades (em milhões de anos) dos nós. mag: *P. magdaleniatum*, cor= *P. corruscans*, ori: *P. orinocoense*, tig: *P. tigrinum*, met: *P. metaense*, ret: *P. reticulatum*, pun: *P. punctifer*, fas: *P. fasciatum*. OR= Orinoco; MD= Magdalena; RU= Rupununni; AM= Amazonas; TO= Tocantins; AR= Araguaia; TU= Turiaçu; PI= Pindaré; ME= Mearim; IT= Itapecuru; PB= Parnaíba; PG= Paraguai; PN= Paraná; UR= Uruguai; SF= São Francisco. Outgroup 1: *Brachyplatystoma*, Outgroup 2: *Zungaro*.

## 5-DISCUSSÃO

### 5.1-Quantas espécies há em *Pseudoplatystoma*?

Complexas genealogias para o gênero *Pseudoplatystoma* foram inferidas a partir dos três marcadores usados neste estudo, incluindo locos de ambos os genomas mitocondrial e nuclear (totalizando mais de 2000 pb). Embora algumas questões tenham sido resolvidas, outras ainda necessitam de respostas.

Os dados obtidos neste estudo são congruentes com aqueles encontrados por Buitrago-Suárez & Burr (2007) e Torrico *et al.* (2009) em relação à singularidade evolutiva de *P. magdaleniatum*, um grupo de bagres que costumava ser considerado uma população de *P. fasciatum* na bacia do Rio Magdalena na Colômbia. *Pseudoplatystoma magdaleniatum* estaria na base da diversificação do grupo, relação essa melhor visualizada nos locos nucleares do que no Citb, que coloca *P. corruscans* junto a essa espécie na base da árvore. Buitrago-Suárez & Burr (2007) apresentam caracteres morfológicos robustos e confiáveis para sustentar *P. magdaleniatum* como uma nova espécie do gênero. Os resultados apóiam essa mudança, haja vista as grandes distâncias genéticas deste clado em relação aos demais.

Apesar da concordância sobre qual grupo estaria na base da filogenia, também foram detectadas incongruências entre os marcadores. A principal delas é quanto às posições ocupadas por *P. corruscans* e o clado *P. tigrinum* nas topologias derivadas do marcador mitocondrial e dos locos nucleares. Torrico *et al.* (2009) encontraram as mesmas relações evolutivas usando o gene do Citocromo b e a região controle do mtDNA (Figura 4), mas, como nos resultados do atual estudo, o suporte estatístico para

esta relação mais basal de *P. corruscans* é fraco. As diferentes dinâmicas evolutivas dos genomas nuclear e mitocondrial, em termos de suas diferentes taxas evolutivas, pode, algumas vezes, produzir inconsistências entre as árvores gênicas usadas para se inferir a árvore de espécies (Zhang & Hewitt, 2003). Entretanto, comprovando a importância da integração de locos nucleares em análises filogenéticas, as filogenias nucleares trazem as relações evolutivas de *P. corruscans* e *P. tigrinum* bem resolvidas, demonstrando que *P. tigrinum* é mais basal do que *P. corruscans*, sendo que este último é quem guarda parentesco evolutivo mais recente com o resto dos táxons. Este cenário é corroborado pela reconstrução filogenética de Buitrago-Suárez (2006) (Figura 3). Os testes para topologias alternativas mostraram que estas não foram significativamente melhores do que as encontradas pelos marcadores. A influência da homoplasia sobre as relações de *P. corruscans* no Citocromo b parece ser bastante forte, ao passo que a evidência dos dados nucleares foi robusta o suficiente para resistir a esses testes, haja vista que sua menor taxa evolutiva, em relação ao mtDNA, minimiza o efeito de homoplasias entre táxons filogeneticamente mais distantes (Avice, 2004; Li *et al.*, 2007). Múltiplas substituições têm uma probabilidade maior de ocorrência em nós mais antigos de uma filogenia, especialmente daquelas derivadas de regiões de altas taxas evolutivas como o mtDNA (Zardoya & Doadrio, 1999). Dessa forma, as relações evolutivas na base da árvore de *Pseudoplatystoma* parecem estar mais esclarecidas nos marcadores nucleares.

Apesar da falta de resolução do Citocromo b para as relações mais antigas dentro de *Pseudoplatystoma*, o mesmo não aconteceu para as relações mais recentes. Os resultados mostraram clados geograficamente separados para *P. corruscans*, correspondendo às populações das drenagens do São Francisco e Paraná-Paraguai-Uruguaí, respectivamente. Buitrago-Suárez (2006) não identificou diferenças morfológicas entre essas populações, mas a divergência genética no Citocromo b sugere

um tempo substancial de separação. Além disso, diferenças ao nível citogenético (número fundamental e a morfologia dos cromossomos) são conhecidas entre essas populações (Swarça *et al.*, 2005). Essa questão não foi abordada em Torrico *et al.* (2009), dado que não havia amostras do São Francisco naquele trabalho. Em populações historicamente separadas e que têm experimentado pouco ou nenhum fluxo gênico, por um longo período de tempo, a divergência evolutiva ocorre inexoravelmente para genes seletivamente neutros e sob seleção (Avice, 2000). A especiação requer o surgimento de diferenças genéticas, especialmente aquelas envolvidas com o isolamento reprodutivo, entre as populações (Lomolino *et al.*, 2006). Se essa divergência evolutiva no Citb entre as populações de *P. corruscans* está associada a barreiras reprodutivas, é algo que merece estudos posteriores. Populações historicamente separadas são candidatas a apresentar diferenças em adaptações porque elas teriam uma exposição potencialmente longa a pressões seletivas divergentes sem a influência homogeneizante do fluxo gênico (Avice, 2000). As populações de *P. corruscans* das drenagens do Paraná-Paraguai-Uruguai e São Francisco deveriam, então, ser consideradas unidades filogeográficas distintas, com potenciais adaptações divergentes que deveriam ser preservadas, de modo que seu manejo deve levar em conta essa distinção.

Outro importante aspecto revelado neste trabalho foi a falta de monofiletismo para *P. metaense* e *P. tigrinum* enquanto espécies distintas. Torrico *et al.* (2009) não abordaram essa questão devido a sua pequena amostragem na bacia do Rio Orinoco. Essas espécies agruparam num clado único em todas as genealogias, até mesmo compartilhando haplótipos. Este grupo foi chamado clado *P. tigrinum*, parecendo representar aquilo que Buitrago-Suárez (2006) chamou de “clado *tigrinum*”. A coesão genética (distância-*p*= 0,2-0,3%) entre essas duas supostas espécies pode implicar na inadequação da terminologia *P. metaense* para delimitar uma espécie válida no Orinoco.

A diagnose de *P. metaense* em Buitrago-Suárez & Burr (2007) é baseada, principalmente, em padrões de forma do corpo e coloração (barras, reticulações e número de pintas), que, segundo os próprios revisores, podem ser polimórficos, o que invalidaria a espécie. Entretanto, uma deleção de 2 pb em *P. metaense* e outra de 4 pb em *P. tigrinum* revelam algum nível de diferenciação no S7int1. Além disso, foi observado um clado altamente apoiado no Rag1int1 constituído por dois indivíduos de *P. metaense*, que diferem dos outros *P. metaense* por muitas mutações fixadas e uma deleção. Neste caso, uma história evolutiva idiossincrática para este íntron explicaria esse resultado como separação incompleta de linhagens, considerando a expectativa teórica de que a separação de linhagens genealógicas em locos autossômicos ocorre em um tempo mais longo (quatro vezes em média) do que para locos mitocondriais (Avice, 2000), e que o íntron do Rag1 foi o marcador mais conservado em termos de seu polimorfismo. Em face desses dados, a hipótese de uma única espécie em ambas as bacias hidrográficas é fortalecida. Por outro lado, a hipótese alternativa (de duas espécies) apenas seria satisfeita se esses achados estiverem associados à separação incompleta de linhagens, o que precisa ser confirmado em estudos posteriores.

Também foi observado, no Citb, um clado bem delimitado contendo as sequências de *P. orinocoense* (antes conhecido como uma população de *P. fasciatum* no Rio Orinoco). Entretanto, há evidente mistura de haplótipos entre este táxon e o clado *P. fasciatum* nos íntrons do Rag1 e S7, possivelmente refletindo um processo incompleto de separação de linhagens. Diferentes tamanhos efetivos populacionais para alguns locos (mtDNA x DNA nuclear) ou distintos padrões de seleção poderiam levar alguns locos a atingir o *status* de monofilia recíproca antes do que outros (Di Candia & Routman, 2007). Há, também, a expectativa de menores tempos de coalescência para os marcadores neutros de mtDNA em relação aos de genes nucleares de cópia única

(Kingman, 1982), o que influencia na velocidade de separação de linhagens dos genomas nuclear e mitocondrial (Avise, 2000). Isso ajuda a explicar porque o gene do Citocromo b delimitou melhor as espécies de *Pseudoplatystoma* (inclusive algumas populações coespecíficas) do que os marcadores autossômicos nucleares.

Curiosamente, algumas poucas amostras dessa espécie agruparam dentro do clado *P. fasciatum* no Citb, onde apresentaram o mesmo haplótipo encontrado em *P. punctifer* do Amazonas. Hipotetiza-se que isto seja resultado de introgressão, separação incompleta de linhagens, migração de peixes do Amazonas para o Orinoco ou até mesmo de introdução mediada por humanos. Expectativas teóricas e evidências empíricas sugerem que genes herdados citoplasmicamente são mais propensos a sofrer introgressão do que seus equivalentes nucleares, uma vez que os genes responsáveis pela incompatibilidade interespecífica residem no genoma nuclear (Matos & Schaal, 2000), a não ser que existam incompatibilidades entre genes mitocondriais e nucleares ou algum tipo de incompatibilidade ligada às fêmeas (Abe *et al.*, 2005). A produção artificial de híbridos de *P. corruscans* x *P. reticulatum* para aquicultura mostra que, na prática, cruzamentos interespecíficos são possíveis dentro do gênero. No entanto, não foram encontradas evidências de hibridização ou introgressão natural entre essas espécies, que são simpátricas nos Rios Paraná e Paraguai. Da mesma forma não foram encontrados indivíduos resultantes de cruzamento entre *P. tigrinum* (clado *P. tigrinum*) e *P. punctifer* (clado *P. fasciatum*), espécies simpátricas no Amazonas. Apesar disso, a hipótese de introgressão de haplótipos mitocondriais de *P. punctifer* para *P. orinocoense* não pode ser descartada. Também não pode ser rejeitada a explicação de que estes peixes sejam migrantes do Amazonas (*P. punctifer*), dado que exemplos de dispersão entre o Amazonas e Orinoco já foram relatados para outros peixes (Lovejoy & Araújo, 2000; Hubert *et al.*, 2007; Willis *et al.*, 2010). Uma evidência a esse favor é uma

deleção de 15 pb presente nesses peixes, que também ocorre no clado *P. fasciatum*, mas não em *P. orinocoense*. Dessa forma, novos estudos são necessários para definir qual dessas hipóteses melhor explica essas amostras. De qualquer forma, a situação de *P. orinocoense* (com exceção dessas amostras) como espécie deveria ser mantida, ao menos pela evidência trazida pelo Citb, uma vez que os dados nucleares parecem ainda estar sob a influência de um processo incompleto de separação de linhagens.

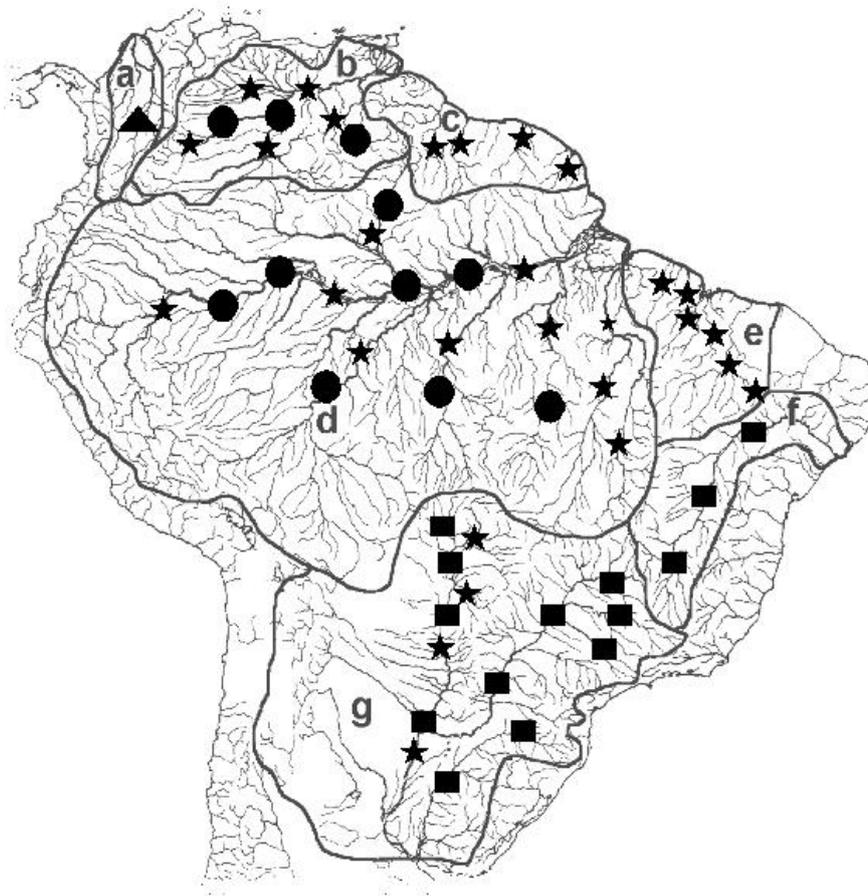
Quanto à situação de *P. reticulatum*, as análises também não mostraram monofiletismo recíproco para estas amostras, exceto com *bootstrap* moderado no Citb (mas com uma pequena divergência genética em relação aos outros membros do clado *P. fasciatum*: 0,5-0,8%). Um evento de especiação recente poderia resultar nessa incipiente diferenciação no Citb e no polimorfismo incompletamente separado nos íntrons. Torrico *et al.* (2009) defendem esta espécie, argumentando que se trata de um clado altamente apoiado, embora apresentem apenas valores moderados de suporte para ele e nenhuma réplica nuclear (Figura 4). Entretanto, constata-se que *P. reticulatum* apresenta distâncias interespecíficas que são inferiores a distâncias interpopulacionais em *Pseudoplatystoma*. Por exemplo, amostras do clado *P. fasciatum* (*P. punctifer*) de drenagens do Maranhão têm 1% de divergência no Citb em relação aos outros peixes do clado. Além disso, as populações de *P. corruscans* do São Francisco e Paraná-Paraguai-Uruguai são 1,5% divergentes no Citb. Portanto, no mínimo deveria haver alguma cautela quanto à aceitação de *P. reticulatum* como espécie válida no sistema Paraná-Paraguai, antes que outros estudos sejam feitos. Além disso, Buitrago-Suárez & Burr (2007) alegam que este táxon está distribuído também no Médio Amazonas, embora nenhum exemplar, que não o holótipo, tenha sido amostrado naquela bacia por eles. Novos estudos serão necessários para responder se *P. reticulatum* também ocorre no Amazonas e se não se trata apenas de um polimorfismo de coloração dentro do clado *P.*

*fasciatum*, já que seu diagnóstico taxonômico é, sobretudo, fundamentado em padrões de coloração, um carácter reconhecidamente problemático para o grupo. Uma demonstração disso é que peixes com coloração similar a *P. reticulatum* estão presentes na amostragem do Amazonas utilizada neste estudo, mas não agruparam com esse táxon na genealogia do Citocromo b.

Similarmente, não foram observadas diferenças genéticas que sustentem *P. fasciatum* (*sensu* Buitrago-Suárez & Burr, 2007). Apesar do pequeno número amostral, as análises indicam, no mínimo, separação incompleta de linhagens, dado que houve haplótipos compartilhados com peixes do Amazonas (Citb, Rag1int1), Orinoco (Rag1int1) e bacias do Maranhão (Rag1int1), embora também existam haplótipos exclusivos das Guianas em todos os marcadores. Torrico *et al.* (2009) também não encontraram diferenças que sustentassem *P. fasciatum* como uma nova espécie.

Sob as expectativas da Teoria Neutra de Evolução Molecular, o tempo (em gerações) após o início do processo de separação de linhagens, gasto nos estados transitórios para a monofilia, depende do tamanho efetivo das populações, mas linhagens polifiléticas e parafiléticas também podem derivar de fluxo gênico pós-separação (Avice, 2000). No presente estudo, espécies reconhecidas na última revisão de *Pseudoplatystoma* não formaram agrupamentos monofiléticos em todos os marcadores ou só se apresentaram dessa forma apenas no gene mitocondrial. Nesta situação encontram-se *P. metaense*, *P. tigrinum*, *P. reticulatum*, *P. punctifer*, *P. fasciatum* e *P. orinocoense*. Pelo fato de apenas *P. magdaleniatum* e *P. corruscans* serem as únicas espécies monofiléticas do gênero em todos os marcadores analisados, sugere-se a realização de novos estudos que visem definir o *status* das espécies que não se adequaram ao Conceito Filogenético de Espécie. Se estes forem casos de separação incompleta de linhagens, esse é um padrão perfeitamente esperado, mas este estudo

mostrou que talvez as novas espécies originadas a partir da divisão de *P. fasciatum* (*sensu* Burgess, 1989), exceto *P. magdaleniatum*, deveriam novamente ser reunidas sob esta terminologia (*P. punctifer*, *P. reticulatum*, *P. fasciatum* e *P. orinocoense*). Da mesma forma, a se confirmar os achados desse trabalho, *P. tigrinum* deveria ser revalidado para o Orinoco. Assim, a antiga classificação do grupo seria parcialmente recuperada: *P. fasciatum*, *P. tigrinum*, *P. magdaleniatum* e *P. corruscans* (Figura 20).



**Figura 20:** Distribuição das espécies de *Pseudoplatystoma* em consequência dos resultados observados para os marcadores moleculares usados neste estudo. Estrela: *P. fasciatum*; Círculo: *P. tigrinum*; Triângulo: *P. magdaleniatum*; Quadrado: *P. corruscans*.

## 5.2-Como a vicariância e a dispersão influenciaram a diversificação de *Pseudoplatystoma*?

As bacias hidrográficas são, por definição, ambientes espacialmente desconectados, onde as populações de organismos aquáticos tendem a apresentar-se diferenciadas geneticamente em relação às populações de outras bacias (Avise, 2000). Contudo, a paisagem e o curso dos rios são dinâmicos ao longo do tempo geológico, de forma que drenagens vizinhas podem passar por ciclos de conexão/separação devido a eventos de captura de cabeceiras ou pela convergência de seus trechos inferiores durante eventos de regressão marinha (Burridge *et al.*, 2006, 2007). Dessa forma, as mudanças na matriz geográfica fornecem as oportunidades para vicariância e dispersão em peixes de água doce, e são os principais atores na formatação da distribuição dos haplótipos desses organismos no espaço geográfico (Avise, 2000). Eventos vicariantes e de dispersão são aqueles que ajudam a explicar a distribuição dos clados de *Pseudoplatystoma* e sua diversificação na região Neotropical.

Segundo Farias & Hrbek (2008), os eventos mais relevantes para diversificação da fauna de peixes da América do Sul são aqueles ligados à história orogênica do Neogeno (Mioceno e Plioceno, 25-1,8 **ma**) e eventos climáticos do Plio-Pleistoceno (5-0,1 **ma**). Os dados coletados neste estudo sobre a história evolutiva de *Pseudoplatystoma* corroboram essa hipótese, na medida em que os eventos envolvidos na diversificação mais antiga do grupo parecem estar relacionados aos acontecimentos geológicos ocorridos no médio Mioceno (eventos vicariantes). Por outro lado, a diversificação mais recente do gênero parece estar mais relacionada às flutuações no nível do mar no Plio-Pleistoceno, que podem ter permitido conexões temporárias entre sistemas hidrográficos

antes isolados, favorecendo a migração de peixes entre essas bacias (eventos de dispersão). Outros estudos com peixes Neotropicais também chegaram a conclusões semelhantes (Lovejoy & Araújo, 2000; Montoya-Burgos, 2003; Chiachio *et al.*, 2008; Cardoso & Montoya-Burgos, 2009; Torrico *et al.*, 2009). Assim, das hipóteses atualmente consideradas para explicar a diversidade de peixes de água doce na América do Sul, a hipótese museu (Fjeldså, 1994; Nores, 1999) e a hidrogeológica (Montoya-Burgos, 2003) parecem ser as mais relacionadas aos dados produzidos neste estudo. Embora não se negue a importância de fatores ecológicos na distribuição dos organismos, este estudo não teve uma abordagem capaz de lidar com essa questão.

A ruptura mais profunda nas filogenias, melhor visualizada nas genealogias dos íntrons, ocorreu entre *P. magdaleniatum* e os demais táxons, representando o evento vicariante que ocasionou o isolamento da drenagem do Magdalena há 11,8 **ma** (Lundberg, 1998). Outros estudos também têm demonstrado que este evento foi responsável pelo início da diversificação em outros táxons de peixes Neotropicais (Sivasundar *et al.*, 2001; Montoya-Burgos, 2003; Turner *et al.*, 2004; Moyer *et al.*, 2005; Albert *et al.*, 2006; Torrico *et al.*, 2009). Este fato, então, justifica o uso desse evento para a calibração do relógio molecular e como *prior* para a análise de datação. Quando calibrada com este evento, a taxa de evolução do Citb fica semelhante àquela encontrada para outros peixes, cujas taxas de evolução variam entre 0,3-1,5% por milhão de anos (Peng *et al.*, 2002; Hardman & Page, 2003), com uma média de 0,5-0,8% por milhão de anos (Zardoya & Doadrio, 1999; Bermingham *et al.*, 1997; Near *et al.*, 2003).

Como visto na seção anterior, o segundo grande evento cladogenético do gênero difere quando se consideram marcadores dos diferentes genomas, ou seja, a história das relações evolutivas de *P. corruscans* e do clado *P. tigrinum* com os demais táxons

difere entre as filogenias mitocondriais e nucleares. De acordo com Zardoya & Doadrio, (1999), os nós mais antigos tem uma probabilidade maior de apresentar múltiplas substituições, confundido as estimativas de tempo de divergência, especialmente no mtDNA devido às suas maiores taxas evolutivas. Dessa forma, entendeu-se que os locos nucleares delinearão melhor o cenário do início da diversificação de *Pseudoplatystoma*, já que eles são menos afetados pelos efeitos da homoplasia em escalas de tempo mais recentes.

A origem desse nó conflituoso, estimada por marcadores de ambos os genomas mitocondrial e nuclear (embora com diferentes combinações de táxons), data de aproximadamente 9 milhões de anos (IC:8,2-9,8), próximo daquela obtida por Torrico *et al.* (2009) (8 milhões de anos). Nos íntrons, este evento marcou a separação entre o clado *P. tigrinum* e *P. corruscans*+*P. orinocoense*+clado *P. fasciatum*. Nessa época, a elevação dos Andes Venezuelanos e do Arco de Valpes atuou separando as bacias do Amazonas e Orinoco, ocasionando o rompimento do Arco de Purus e a mudança na direção da bacia Amazônica para o seu curso atual (Hoorn, 1993; Hoorn *et al.*, 1995; Lundberg *et al.*, 1998; Gregory-Wodzicki, 2000). Então, o evento tectônico que culminou na separação entre o Amazonas e o Orinoco, provavelmente, resultou na distribuição alopátrica dessas linhagens. Hubert & Renno (2006) discutem que o âmbito da distribuição de espécies de Characiformes é consistente com a hipótese de que o surgimento dos arcos de Vaupes foi um dos principais eventos a promover divergência alopátrica entre peixes do Amazonas e Orinoco. Espécies irmãs putativas de piranhas (*Pygocentrus natterii* e *P. Cariba*) também têm distribuições alopátricas no Amazonas e Orinoco, respectivamente, o que aponta para o evento vicariante entre essas duas bacias como explicação para essa distribuição (Winemiller *et al.*, 2008). Hubert *et al.* (2007) também indicam o estabelecimento final do Amazonas e Orinoco como o

desencadeador da diversificação de alguns clados de piranhas. Sivasundar *et al.* (2001) mostrou que em *Prochilodus*, a segunda quebra de linhagens, após a que deu origem à linhagem do Magdalena, foi a do Orinoco em relação ao Amazonas.

A distribuição atual de membros do clado *P. tigrinum* no Amazonas pode ser explicada por dispersão pós-diferenciação alopátrica no Orinoco, presumivelmente, através do Rio Casiquiare (Figura 1), que captura águas das cabeceiras do Orinoco, mas drena para o Rio Negro, o maior tributário do Amazonas (Rice, 1921). Esta rota potencial pode ter permitido a dispersão e o subsequente aumento do âmbito geográfico deste clado para o Amazonas e até mesmo fluxo gênico contemporâneo entre peixes dessas bacias. Espécies como a piranha *Serrasalmus rhombeus*, o bagre *Phractocephalus hemiliopterus* e o boto *Inia geoffrensis* têm distribuições no Orinoco, Casiquiare e Amazonas, indicando uma possível influência do Casiquiare nessa distribuição (Winemiller *et al.*, 2008). Uma dispersão do Orinoco para o Amazonas, via Casiquiare, também pode ser responsável pela distribuição de outra espécie de piranha (*Serrasalmus manuelei*: Freeman *et al.*, 2007; Hubert *et al.*, 2007). O padrão de distribuição de outras espécies como *Hydrolycus wallacei* (Toledo-Pizza *et al.*, 1999), *Boulengerella laterstrigata* (Vari, 1995), *Curimatopsis evelynae* (Vari, 1982), *Cyphocharax multilineatus* e *C. gangamon* (Vari, 1992), *Caenotropus mestomorgmatos* (Vari *et al.*, 1995) e *Creagrutus runa* e *C. zephyrus* (Vari & Harold, 2001) também pode estar relacionado com a emergência dessa rota de dispersão. Willis *et al.* (2007) e Willis *et al.* (2010) mostraram o papel do Rio Casiquiare no fluxo gênico e na distribuição de espécies do gênero *Cichla* (Cichlidae), apontando dispersão do Orinoco para o Amazonas, como sugerido no presente trabalho. Entretanto, outros estudos têm relatado que, talvez, essa passagem não permita a dispersão para qualquer grupo de peixes (Lovejoy & Araújo, 2000; Turner *et al.*, 2004), possivelmente, devido aos “filtros”

como as corredeiras do Alto Orinoco e os gradientes químicos entre as águas claras do Alto Orinoco e as águas escuras do Rio Negro (Winemiller *et al.*, 2008). Peixes com distribuições restritas ao Amazonas incluem a aruanã (*Osteoglossum* spp.), o pirarucu (*Arapaima gigas*), o acará-disco (*Symphysodon* spp.), etc, indicando que estes filtros podem exercer alguma influência na dispersão de peixes entre essas bacias (Willis *et al.*, 2010). No presente estudo, os peixes do Amazonas e Orinoco apresentaram haplótipos em comum (embora fossem os mais frequentes) no Citb e Rag1int1, um padrão compatível também com a separação incompleta de linhagens. Como essas populações ainda não atingiram a condição de monofiletismo para os marcadores usados neste estudo não foi possível precisar o tempo aproximado do evento de dispersão para o Amazonas. Contudo, alguma diferenciação incipiente pode estar em curso, evidenciada por haplótipos não compartilhados entre as bacias. A ocorrência atual de fluxo gênico entre essas populações necessita de estudos com marcadores mais polimórficos e mais aptos a lidar com eventos recentes (ex. microssatélites).

Em seguida, segundo as filogenias nucleares, ocorreu a cladogênese de *P. corruscans* (7,4 **ma**), que pode estar relacionada ao rompimento entre o Amazonas e o paleo Paraná-Paraguai-Uruguai-São Francisco. Entretanto, esta data e seu intervalo de confiança não são consistentes com a idade estimada para a vicariância entre essas drenagens, ocorrida entre 11,8-10 **ma** (Lundberg *et al.*, 1998). Assim, este evento não estaria, *a priori*, envolvido nessa diversificação. A hipótese de vicariância pode ser excluída se evidências geológicas mostram que a barreira entre as áreas existia antes dos táxons ocorrerem lá, ou se estudos moleculares mostram que o tempo de divergência entre os táxons são mais recentes do que a idade de formação da barreira (Lomolino *et al.*, 2006). Não obstante, Torrico *et al.* (2009) dataram a divergência de *P. corruscans* em 11,8 **ma**, uma idade concordante com o evento vicariante. Contudo, esses autores

usaram apenas marcadores mitocondriais, que não se mostraram eficientes para este propósito no presente estudo, devido, provavelmente, à homoplasia. Com base em nossa datação, propõe-se para *P. corruscans* um evento de dispersão, a partir da bacia Amazônica, seguido de diferenciação alopátrica no sistema Paraná-Paraguai ou no Rio São Francisco. Lundberg *et al.* (1998) relatam eventos de captura de cabeceiras entre o Alto Madeira (tributário da margem direita do Amazonas) e o Alto Rio Paraguai nos últimos 10 **ma**, que podem ter oportunizado rotas de dispersão entre essas bacias para o ancestral de *P. corruscans*. Hubert & Renno (2006) indicam relações evolutivas entre os Characiformes com distribuições restritas aos rios Paraguai e Tapajós (tributário da margem direita do Amazonas), sugerindo trocas faunísticas por eventos de captura de cabeceiras. Montoya-Burgos (2003), num estudo com loricariídeos do gênero *Hypostomus*, estimou a separação entre os grupos do Paraná-Paraguai e do Paleo Amazonas-Orinoco entre 11,4 e 10,5 milhões de anos, usando marcadores mitocondriais e nucleares e um modelo de relógio molecular estrito, mostrando que nesse caso o evento vicariante pode estar implicado na diversificação e distribuição do grupo.

De acordo com a estimativa do Citocromo b, as populações de *P. corruscans* do São Francisco e Paraná-Paraguai-Urugui estão separadas há 5,9 **ma**, e suas causas podem envolver tanto eventos vicariantes quanto dispersão. A hipótese vicariante não pode ser descartada porque o registro geológico sobre a separação entre o Alto Paraná e o São Francisco tem um amplo intervalo de tempo (65-1,8 **ma**; Beurlen, 1970; Lundberg *et al.*, 1998). Entretanto, também há evidências de captura de cabeceiras do Alto Paraná pela bacia do Rio São Francisco entre 5,5 e 6,4 **ma** (Montoya-Burgos, 2003), próximo à data estimada para a divergência populacional. Não foram encontradas grandes diferenças entre as populações do Rio Uruguai e aquelas do Paraná-Paraguai, possivelmente, pela oportunidade de dispersão pelo Rio da Prata, uma

rota que tem sido mantida inalterada nos últimos 10 **ma** (Lundberg *et al.*, 1998). Muitas populações de outras espécies também estão distribuídas nas três grandes bacias desse sistema, usando o Rio da Prata como rota dispersão (e.x. Sivasundar *et al.*, 2001).

O evento vicariante que, dentro do processo de diversificação do gênero, deu origem ao clado *P. tigrinum* não foi o mesmo que originou o outro grupo de peixes do Orinoco (*P. orinocoense*). Pela sua afinidade evolutiva com membros do clado *P. fasciatum*, *P. orinocoense* pode ter chegado ao Orinoco pelo Amazonas ou pelos rios costeiros das Guianas. Infelizmente, não houve resolução suficiente, fornecida pela história dos marcadores, para estimar o tempo de divergência deste táxon, mas pela topologia ele é mais recente que o clado *P. tigrinum*. Neste caso, não se poderia relacionar sua cladogênese com a separação Amazonas-Orinoco, como ocorreu para o clado *P. tigrinum*, mas a um processo de dispersão Amazonas/Guianas para o Orinoco. Este tipo de dispersão também foi revelado para *Serrasalmus rhombeus*, *Serrasalmus elongatus*, *Serrasalmus serrulatus* e *Pristobrycon calmoni*, táxons amplamente distribuídos na Amazônia (Hubert *et al.*, 2007).

No clado *P. fasciatum*, o nó de *P. reticulatum* no Citb está datado em 4,1 **ma** (IC: 2-6 Ma), acima do estimado por Torrico *et al.* (2009) (0,8 e 1,5 **ma**). Entretanto, ambas as estimativas são bem mais recentes do que vicariância entre Amazonas e Paraná-Paraguai (11,8-10; Lundberg *et al.*, 1998). Neste caso, eventos de migração por captura de cabeceira entre tributários da margem direita do Amazonas e o Paraná-Paraguai podem estar envolvidos nessa explicação. Hubert *et al.* (2007) sugerem colonizações de piranhas no Rio Paraguai vindas da bacia Amazônica há 2 **ma**. Uma divergência populacional pós-dispersão entre as populações amazônicas e do Paraná-Paraguai também foi registrada para *Prochilodus* entre 2,3 e 4.1 **ma** (Sivasundar *et al.*, 2001), similar à história contada pelos marcadores usados neste trabalho. Como *P.*

*reticulatum* tem relações evolutivas mais próximas com o restante do clado *P. fasciatum*, supõe-se que esta população foi fundada por peixes vindos da bacia Amazônica, que chegaram através da bacia do Paraguai, uma vez que estes peixes não ocorrem, naturalmente, no São Francisco e Alto Paraná. Lundberg *et al.* (1998) relatam eventos de captura de cabeceiras entre o Alto Madeira (tributário da margem direita do Amazonas) e o Alto Rio Paraguai nos últimos 10 **ma**, que podem ter oportunizado rotas de dispersão entre essas bacias para este membro do clado *P. fasciatum*.

A captura de rios é, potencialmente, uma força geomorfológica importante para expansão e cladogênese em táxons de água doce (Burrige *et al.*, 2006, 2007; Waters *et al.*, 2007). Alguns trabalhos têm sugerido que eventos de captura de cabeceiras e conexões temporárias entre cabeceiras de rios das bacias do Amazonas e Paraná-Paraguai podem ter promovido especiação por meio de dispersão de longa distância seguida de divergência alopátrica (Lovejoy & Araújo, 2000; Montoya-Burgos, 2003; Hubert *et al.*, 2007). Outros casos de dispersão entre esses dois sistemas hidrográficos foram detectados dentro da família Callichthyidae (Reis, 1998). Hubert *et al.* (2007) apresentam dados que sugerem dispersão de *Pygocentrus nattereri* do Alto Amazonas para o Alto Paraguai há cerca de 1,8 **ma**. A influência da dispersão na distribuição de outros peixes nessas duas bacias também é exemplificada por *Psectrogaster curviventris* (Vari, 1989b), *Hemiodus orthonops* (Langeani, 2003), *Acestrorhynchus altus* e *A. pantaneiro* (Menezes, 2003) e *Pyrrhulina australis* (Weitzman & Weitzman 2003). Hubert & Renno (2006), num amplo trabalho sobre distribuição de espécies de Characiformes Sul-Americanos, também acharam padrões de distribuição semelhantes. Sivasundar *et al.* (2001) encontraram discordâncias entre datações moleculares e geológicas para *Prochilodus*, que são melhor explicadas pelo cenário de troca de faunas entre o Amazonas e o Paraná-Paraguai. No caso de *P. reticulatum*, o tempo de

ocorrência deste evento não foi suficiente para levar ao monofiletismo da linhagem nos locos nucleares, apesar de formar um clado apenas moderadamente apoiado no Citocromo b.

No restante do clado *P. fasciatum* podem ser hipotetizados eventos de dispersão para explicar a ocorrência de peixes (*P. punctifer*) nas bacias do Maranhão (Pindaré, Mearim, Itapecuru e Parnaíba), que, segundo as datações do Citocromo b, dispersaram para lá há 3,75 milhões de anos (IC: 2-5,5), possivelmente, vindos do Amazonas. Contudo, os peixes do Rio Turiaçu, uma pequena bacia do Noroeste do Estado, possuem relações evolutivas mais próximas com os peixes da bacia do Amazonas do que com outras bacias maranhenses, indicando sua origem mais recente. Além disso, os peixes do Parnaíba apresentam haplótipos diferenciados em relação aos peixes das outras bacias do Maranhão. De acordo com Hubert & Renno (2006), as drenagens do Maranhão formam um clado isolado e divergente para alguns Characiformes, com um número substancial de espécies endêmicas, mas o Rio Parnaíba possui um padrão diferenciado do resto do Estado. Entre as bacias do Itapecuru e Pindaré-Mearim, a movimentação pode ter sido promovida por conexões temporárias entre esses rios durante regressões marinhas, já que todos deságuam na baía de São Marcos. O último grande evento desse tipo pode ter ocorrido entre 5-6 milhões de anos (Vail & Hardenbol, 1979) e pode ter permitido interconexões entre rios pelas suas desembocaduras, favorecendo a dispersão entre bacias antes isoladas. De forma oposta, o aumento subsequente no nível do mar pode fragmentar populações nos rios antes interligados, promovendo diferenciação alopátrica (Cardoso & Montoya-Burgos, 2009). Hubert & Renno (2006) explicam a presença de espécies em comum entre rios do Maranhão e da bacia Amazônica (Rio Trombetas) pela ocorrência de dispersão via litoral durante períodos de regressão marinha. Os dados do presente trabalho sugerem

mais de um evento de colonização por *Pseudoplatystoma* no Maranhão, entretanto, essa história merece estudos mais aprofundados e com uma amostragem mais densa do que a usada neste trabalho capaz de testar cenários de dispersão alternativos (via litoral ou por captura de cabeceiras).

Representantes do clado *P. fasciatum* da drenagem do Amazonas (*P. punctifer*), coletados em diferentes localidades ao longo do rio principal e tributários, não mostraram sinais de diferenciação genética, exceto no Rio Xingu onde houve haplótipos exclusivos no Citb, que divergiram há 1,1 **ma** (IC: 0,1-2,3) dos outros peixes do Amazonas. Essa divergência para amostras de peixes do Xingú já foi observada em outros trabalhos. Por exemplo, a fauna de Cichlasomatine do Xingu é considerada antiga e evolutivamente independente há um longo período de tempo (Hubert & Renno, 2006). Farias & Hrbek (2008), estudando peixes do gênero *Symphysodon* (acará-disco) na bacia Amazônica, também revelaram uma linhagem divergente desses peixes no Rio Xingú. Essas diferenças encontradas no Xingú podem decorrer do mesmo processo responsável pelo alto endemismo que caracteriza este tributário (Zuanon, 1999), considerando que as flutuações Plio-Pleistocênicas no nível do mar podem ter repetidamente isolado e conectado os tributários do Baixo Amazonas (Pillans *et al.*, 1998; Liu & Herbert, 2004). O tempo de divergência desses peixes em relação aos outros membros do clado *P. fasciatum* corrobora essa expectativa. Vari & Weitzman (1990) e Hubert & Renno (2006) ressaltam que os tributários dos Amazonas têm uma história complexa e incluem diversas áreas de endemismo. Hubert & Renno (2006) relatam que a fauna de Characiformes do Alto e Baixo Amazonas é suficientemente distinta para considerá-las como áreas de endemismo distintas. Porém, a amostragem pouco densa de exemplares do clado *P. fasciatum* nos diferentes trechos e tributários do

Amazonas pode não ter sido suficiente para conclusões mais seguras sobre a existência dessas áreas para *Pseudoplatystoma*.

Peixes de grandes bacias hidrográficas, como o Amazonas, podem ter tido menos oportunidade para divergência alopátrica devido à continuidade do habitat, embora atributos ecológicos e mudanças históricas dentro da bacia possam promover vicariância (Hoorn *et al.*, 1995; Räsänen *et al.*, 1995; Petry *et al.*, 2003). Além disso, o comportamento migratório de peixes como *Pseudoplatystoma* pode, *a priori*, ajudar a prevenir a associação entre os haplótipos e a geografia. Sivasundar *et al.* (2001) também encontraram pouca associação entre os haplótipos do peixe migratório *Prochilodus lineatus* e as localidades de amostragem ao longo de mais de 1.500 km na bacia do Paraná–Paraguai.

Eventos de dispersão também são apoiados pelos dados para explicar a distribuição de peixes com haplótipos evolutivamente próximos aos do Amazonas na bacia do Tocantins-Araguaia, cujos rios deságuam no Oceano Atlântico próximo à foz do Rio Amazonas. Da mesma forma, esta é a explicação mais parcimoniosa para a ocorrência de peixes do clado *P. fasciatum* nas pequenas bacias das Guianas (*P. fasciatum sensu* Buitrago-Suárez & Burr, 2007) e uma das explicações para aqueles *P. orinocoense* que apresentaram o mesmo haplótipo de peixes do Amazonas (*P. punctifer*). Buitrago-Suárez & Burr (2007) restringiram a distribuição de *P. fasciatum* aos rios costeiros das Guianas, embora seja difícil testar a origem deste táxon, uma vez que o Escudo das Guianas antecede a formação dos grandes sistemas hidrográficos da América do Sul (Lundberg *et al.*, 2000). Essas pequenas bacias drenam em direção ao Oceano Atlântico e estão isoladas do Amazonas por uma série de formações montanhosas antigas na borda norte do Brasil (Cardoso & Montoya-Burgos, 2009). Sabe-se que a geomorfologia do Escudo das Guianas tem permanecido inalterada por

um longo período do tempo geológico (Gibbs & Brown 1993), de modo que este aspecto é de pequena relevância na explicação da distribuição de *Pseudoplatystoma* na região. Entretanto, conexões entre o Amazonas e rios das Guianas têm sido hipotetizadas por meio das savannas inundáveis no Rio Rupununi, de onde procedem nossas amostras, durante a estação chuvosa, criando conexões temporárias entre tributários dos rios Negro (Amazonas) e Essequibo (Rupununi) (Lowe-McConnell, 1964). Outra rota hipotética entre essas drenagens é pelos pântanos costeiros do Estado do Amapá, ligando o delta do Amazonas ao Baixo Oyapoque durante épocas de flutuações no nível do mar decorrentes do período glacial-interglacial, algo compatível com o padrão de distribuição de vários peixes dessa região (Bermingham & Martin, 1998; Jégu & Keith, 1999; Jégu *et al.*, 2002; Montoya-Burgos, 2003; Willis *et al.*, 2007). Flutuações no nível do mar têm ocorrido nos últimos 6-5 milhões de anos (Vail & Hardenbol, 1979), com um ritmo acelerado durante o Pleistoceno (Miller *et al.*, 2005). Os eventos mais recentes e de grande magnitude atingiram reduções de até 120 metros no nível do mar (Bintanja *et al.*, 2005).

A região das Guianas é considerada uma região de endemismo para peixes de água doce (Keith *et al.*, 2006; De Chambrier & Montoya-Burgos, 2008; Rosa *et al.*, 2008). Além disso, estudos genéticos e morfológicos têm mostrado que linhagens de peixes das Guianas apresentam relações evolutivas mais recentes com linhagens amazônicas, sugerindo que tenham se originado de ancestrais dessa região, confirmando a importância dessas conexões (Vari, 1988; Renno *et al.*, 1990; Lovejoy & Araujo, 2000; Montoya-Burgos, 2003; Turner *et al.*, 2004; Hubert & Renno, 2006; Willis *et al.*, 2007; Cardoso & Montoya-Burgos, 2009). É provável que a colonização de *Pseudoplatystoma* nos rios das Guianas seja recente e tenha como fonte o Amazonas, todavia, amostragens em mais rios da região são necessárias para conclusões mais

confiáveis. Buitrago-Suárez & Burr (2007) sugerem dispersão a partir do Amazonas seguida de diversificação como explicação para a distribuição desse grupo de peixes.

Apesar de o presente estudo ter sido a primeira tentativa mais abrangente de revelar os aspectos biogeográficos envolvidos na diversificação de *Pseudoplatystoma*, é indispensável uma amostragem mais densa dentro de cada bacia com o intuito de desvendar se toda a extensão de uma drenagem corresponde a uma mesma história biogeográfica ou se há padrões mais complexos envolvidos. Sob a premissa de que a separação entre o Magdalena e as outras bacias Sul-Americanas reflete o primeiro evento cladogenético do gênero *Pseudoplatystoma*, este trabalho permitiu identificar e datar os outros eventos de diversificação do gênero ligados a mudanças hidrogeológicas e também à dispersão promovida por regressões marinhas. Os eventos cladogenéticos, aqui propostos, estão em consonância com as mudanças geomorfológicas e/ou climáticas geograficamente e temporalmente documentadas para a América do Sul, que seriam as causas primárias da diversificação dos peixes de água doce do continente.

## 6-CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou através do método filogenético e marcadores de DNA mitocondrial e nuclear que algumas espécies de *Pseudoplatystoma*, resultantes da última revisão do gênero, não correspondem a grupos monofiléticos ou não tiveram clados significativamente apoiados em todas as árvores. Dessa forma, sugere-se uma nova revisão no grupo a fim de verificar a realidade dessas espécies não monofiléticas em um ou mais marcadores (*P. punctifer*, *P. reticulatum*, *P. orinocoense* e *P. fasciatum*, *P. tigrinum* e *P. metaense*). Se novos estudos confirmarem estes resultados, parte da antiga classificação do grupo seria recuperada caso *P. fasciatum* (*sensu* Burgess, 1989) fosse reconsiderado para *P. punctifer*, *P. reticulatum*, *P. orinocoense* e *P. fasciatum*, e se *P. tigrinum* fosse revalidado para o Rio Orinoco.

A diversificação do gênero *Pseudoplatystoma* foi resultado de milhões de anos de evolução e fortemente influenciada pela evolução da matriz geográfica Sul-Americana. O estudo biogeográfico nos permitiu corroborar a origem Miocênica da diversificação do grupo, bem como identificar e datar os eventos de diversificação importantes do gênero, e relacioná-los às mudanças geomorfológicas e/ou climáticas conhecidas para a América dos Sul, que seriam as causas primárias de diversificação dos peixes de água doce do continente.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, T.A.; Spence, J.R.; Sperling, F.A.H. 2005. Mitochondrial introgression is restricted relative to nuclear markers in a water strider (Hemiptera: Gerridae) hybrid zone. *Canadian Journal of Zoology*, 83, 432-444.

Agudelo-Córdoba, E.; Salinas Coy, Y.; SánchezPáez, C.L.; Muñoz-Sosa, D.L.; Alonso González, J.C.; Arteaga Díaz, M.E.; Rodríguez Prieto, O.J.; Anzola Potes, N.R.; Acosta Muñoz, L.E.; Núñez Avellaneda, M.; Valdés Carrillo, H. 2000. *Bagres de la Amazonía Colombiana: un recurso sin fronteras*. Bogotá: SINCHI. 253 p.

Akaike, H. 1974. A new look at statistical model identification. *IEEE Transactions of Automatic Control*, 19: 716-723.

Akihito, A.; Kobayashi, T.; Ikeo, K.; Imanishi, T.; Ono, H.; Umehara, Y.; Hamamatsu, C.; Sugiyama, K.; Ikeda, Y.; Sakamoto, K.; Fumihito, A.; Ohno, S.; Gojobori, T. 2000. Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b genes. *Gene*, 259: 5-15.

Albert, J.S. & Crampton, W.G.R. 2005. Diversity and Phylogeny of Neotropical Electric Fishes (Gymnotiformes). In: Bullock, T.H.; Hopkins, C.D.; Popper, A.N.; Fay, R.R. (Eds). *Electroreception*. Nova Iorque: Springer. 360-409.

Albert, J.S.; Lovejoy, N.R.; Crampton, W.G.R. 2006. Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South America Earth Sciences*, 21: 14-27.

Aljanabi, S.M. & Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.

Andrade, F.; Schneider, H.; Farias, I.; Feldberg, E.; Sampaio, I. 2001. Análise filogenética de duas espécies simpátricas de tucunaré (*Cichla*, Perciformes), com registro de hibridização em diferentes pontos da bacia Amazônica. *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica de Universidade Federal do Pará*, 1: 1-11.

Antunes, A.; Templeton, A.R.; Guyomard, R.; Alexandrino, P. 2002. The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: genealogy of the transferrin gene in the brown trout. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 1272-1287.

Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815.

Arnason, E. & Rand, D.M. 1992. Heteroplasmy of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Genetics*, 132: 211-220.

Arratia, G. & Cione, A. 1996. The record of fossil fishes of southern South America. In: Arratia, G. (Ed.). *Contributions of Southern South America to Vertebrate Paleontology*. Munique: Verlag Dr. F. Pfeil, 340 p.

Avise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 312: 325-342.

Avise, J.C. & Saunders, N.C. 1987. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics*, 108: 237-355.

Avise, J.C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43: 1192-1208.

Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press. 447 p.

Avise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. Sunderland: Sinauer Associates. 541 p.

Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13: 729-744.

Bandelt, H-J; Forster, P.; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.

Banford, H.M.; Bermingham, E.; Collette, B.B. 2004. Molecular phylogenetics and biogeography of transisthmian and amphi-Atlantic needlefishes (Belontiidae: *Strongylura* and *Tylosurus*): perspectives on New World marine speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 833-851

Barracough, T.G. & Vogler, A.P. 2000. Detecting the geographical pattern of speciation from species-level phylogenies. *The American Naturalist*, 155: 419-434.

Barthem, R. & Goulding, M. 1997. The Catfish Connection: Ecology, migration and conservation of amazon predators. Nova Iorque: Columbia University Press. 137 p.

Bates, J.M.; Hackett, S.J.; Cracraft, J. 1998. Area-relationships in the Neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of passerine birds. *Journal of Biogeography*, 25: 783-793.

Beheregaray, L.B. & Caccone, A. 2007. Cryptic biodiversity in a changing world. *Journal of Biology*, 6: 9.

Bermingham, E. & Avise, J.C. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics*, 113: 939-965.

Bermingham, E.; Lamb, T.; Avise, J.C. 1986. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. *Journal of Heredity*, 77: 249-252.

Bermingham, E.S.; McCaVerty, S.; Martin, A.P. 1997. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. In: Kocher, T. & Stepien, C.A. (Eds.). *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press. pp. 113-128.

Bermingham, E. & Martin, A.P. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of Neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7: 499-517.

Bernardi, G.; D'Onofrio, G.; Caccio, S.; Bernardi, G. 1993. Molecular phylogeny of bony fishes, based on the aminoacid sequence of the growth hormone. *Journal of Molecular Evolution*, 37: 644-649.

Beurlen, K. 1970. *Geologie Von Brasilien*. Berlin/Stuttgart: Gebrüder Borntraeger. 444 p.

Bintanja, R.; van de Wal, R.S.W.; Oerlemans, J. 2005. Modelled atmospheric temperatures and global sea levels over the past million years. *Nature*, 437: 125-128.

Bishop, P. 1995. Drainage rearrangement by river capture, beheading and diversion. *Progress in Physical Geography*, 19: 449-473.

Bleeker, P. 1862. *Atlas ichthologique des indes Orientales Neerlandais, Tome II Silurodes, Chacoides et Heterobranchoides*. Amsterdam: J. Smith and Gide.

Bockmann, F.A. & Guazzelli, G.M. 2003. Heptapteridae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 406-431.

Böhlke, J.E.; Weitzman, S.H.; Menezes, N.A. 1978. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazonica*, 8: 657-677.

Brown, W.M.; George, M.; Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 76: 1967-1971.

Brown, W.M.; Prager, E.M.; Wang, A.; Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 225-239

Buitrago-Suárez, U.A. 2006. Anatomía comparada y evolución de las especies de *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 (Siluriformes: Pimelodidae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 30: 117-141.

Buitrago-Suárez, U.A. & Burr, B.M. 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, 1512: 1-38.

Burgess, W.E. 1989. *An Atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes*. Neptune City: T. F. H Publications, Inc. 800 p.

BurrIDGE, C.P.; CRAW, D.; WATERS, J.M. 2006. River capture, range expansion, and cladogenesis: the genetic signature of freshwater vicariance. *Evolution*, 60: 1038-1049.

BurrIDGE, C.P.; CRAW, D.; WATERS, J.M. 2007. An empirical test of freshwater vicariance via river capture. *Molecular Ecology*, 16: 1883-1895.

Calcagnotto, D.; Schaefer, S.A.; DeSalle, R. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 135-153.

Cardoso, Y.P. & Montoya-Burgos, J.I. 2009. Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region *Molecular Ecology*, 18: 947-964.

Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A. 2003. *Migratory fishes of South America. Biology, fisheries and conservation status*. Victoria: World Fisheries Trust. 388 p.

Carvalho-Costa, L.F. & Galetti Jr, P.M. 2007a. Análises preliminares da variação genética em espécies do gênero *Pseudoplatystoma* Bleeker, 1862 (Teleostei: Pimelodidae) e seus híbridos induzidos. In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia. Resumos do 53º Congresso Brasileiro de Genética.

Carvalho-Costa, L.F. & Galetti Jr, P.M. 2007b. Avaliação da resolução filogenética da região controle do DNA mitocondrial em bagres do gênero *Pseudoplatystoma* Bleeker,

1862 (Teleostei: Pimelodidae). In: 7ª Jornada Científica da UFSCar/ IV Congresso de Pós-Graduação, São Carlos. Anais IV Congresso de Pós-Graduação.

Carvalho-Costa, L.F.; Piorski, N.M.; Galetti Jr, P.M. 2007. Avaliação preliminar da estrutura genética do surubim *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei: Pimelodidae) em um sistema hidrográfico do Maranhão. In: I Simpósio de Ecologia do PPGERN - UFSCAR, São Carlos. Resumos I Simpósio de Ecologia do PPGERN – UFSCAR.

Carvalho-Costa, L.F.; Willis, S.C.; Piorski, N.M.; Ortí, G.; Galetti Jr, P.M. 2008. Filogenia molecular preliminar dos grandes bagres Neotropicais do gênero *Pseudoplatystoma* Bleeker, 1862 (Teleostei: Pimelodidae). In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética.

Carvalho-Costa, L.F.; Willis, S.C.; Piorski, N.M.; Ortí, G.; Galetti Jr, P.M. 2009a. Filogenia e sistemática molecular do bagre Neotropical *Pseudoplatystoma* Bleeker, 1862 (Teleostei: Pimelodidae) a partir de marcadores mitocondriais e nucleares. In: XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Ponta Grossa, Resumos do XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes.

Carvalho-Costa, L.F.; Piorski, N.M.; Ortí, G.; Galetti Jr., P.M. 2009b. Análise da estrutura genética e demografia histórica em populações do bagre de água doce *Pseudoplatystoma* cf *punctifer* (Teleostei: Pimelodidae) de dois rios do Estado do Maranhão. In: VI Congresso de Meio Ambiente da AUGM. São Carlos. Resumos do VI Congresso de Meio Ambiente da AUGM.

Castro, R.M. & Vari, R.P. 2004. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 622: 1-189.

Cavalli-Sforza, L.L. 1998. The DNA revolution in population genetics. *Trends in Genetics*, 14: 60-65.

Chiachio, M.C.; Oliveira, C.; Montoya-Burgos, J.I. 2008. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 606-617.

Chow, S. & Hazama, K. 1998. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology*, 7: 1247-1263.

Clabaut, C.; Salzburger, W.; Meyer, A. 2005. Comparative phylogenetic analyses of the adaptive radiation of lake Tanganyika cichlid fish: nuclear sequences are less homoplasious but also less informative than mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 61: 666-681.

Clark, A.G. 1990. Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. *Molecular Biology and Evolution*, 7: 111-122.

Colinvaux, P.A. & De Oliveira, P.E. 2001. Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic. *Palaeogeography Palaeoclimatology and Palaeoecology*, 166: 51-63.

Cordani, U.G.; Sato, K.; Teixeira, W.; Tassinari, C.C.G.; Basei, M.A.S. 2000. Crustal evolution of the South American platform. In: Cordani, U.G.; Milani, E.J.; Thomaz-Filho, A.; Campos, D.d.A. (Eds.). *Tectonic Evolution of South America*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências & Departamento Nacional da Produção Mineral. pp. 19-40.

Cordiviola, E. 1966. *Nuevos Aportes de la Biología Pesquera del "Surubi" (Pseudoplatystoma corruscans) en el Paraná Medio (Pisces, Siluriformes)*. Buenos Aires: Physis. 244p

Coronel, J.S.; Maes, J.E.; Claus, S.; Vandamme, P.A.; Volckaert, F.A.M. 2004. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *Journal of Fish Biology*, 65: 859-868.

Cortes, P.; Ye, Z-S.; Baltimore, D. 1994. RAG-1 interacts with the repeated amino acid motif of the human homologue of the yeast protein SRP1 [V(D)J recomblon/nuclear envdepe]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 7633-7637.

Costa, J.B.S.; Léa Bemerguy, R.; Hasui, Y.; da Silva Borges, M. 2001. Tectonics and paleogeography along the Amazon river. *Journal of South America Earth Sciences*, 14: 335-347.

Coyne, J.A. & Orr, H.A. 2004. *Speciation*. 1.ed. Sunderland: Sinauer Associates. 545 p.

Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concept for understanding patterns and processes of differentiation. In: Otte, D. & Endler, J.A. (Ed). *Speciation and its consequences*. Sunderland: Sinauer Associates. Cap. 2.

Cronin, M.A. 1993. In my experience: Mitochondrial DNA in wildlife taxonomy and conservation biology: cautionary notes. *Wildlife Society Bulletin*, 21: 339-348

Curtis, J.; Fraga, L.A.; De Souza, C.P.; Correa-Oliveira, R.; Minchella, D.J. 2001. Widespread heteroplasmy in *Schistosomes* makes an mtVNTR marker “nearsighted”. *Journal of Heredity*, 92: 248-253.

De Chambrier, S. & Montoya-Burgos, J.I. 2008. *Pseudancistrus corantijniensis*, a new species from the Guyana Shield (Siluriformes: Loricariidae) with a molecular and morphological description of the *Pseudancistrus barbatus* group. *Zootaxa*, 1918: 45-58.

De Pinna, M.C.C. 1993. Higher level phylogeny of Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi), with a new classification of the order. Unpublished *PhD. Dissertation*. Nova Iorque: University of New York. 428p.

De Pinna, M.C.C. 1998. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S.; Lucena, Z.M.S. (Eds.).

*Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS. pp. 279–330.

De Queiroz, A. 1993. For consensus (sometimes). *Systematic Biology*, 42: 368-372.

Dergam, J.A.; Suzuki, H.I.; Shibatta, O.A.; Duboc, L.F.; Júlio Jr., H.F.; Guiliano-Caetano, L.; Black IV, W.C. 1998. Molecular biogeography of the Neotropical fishes *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçú, Tibagi, and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology*, 21: 493-496.

Dergam, J.A.; Paiva, S.R.; SchaeVer, C.E.; Godinho, A.L.; Vieira, F. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces: Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 25: 379-387.

Diaz de Gamero, M.L. 1996. The changing course of the Orinoco River during the Neogene: a review. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*, 123: 385-402.

Di Candia, M.R. & Routman, E.J. 2007. Cytonuclear discordance across a leopard frog contact zone. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 564-575.

Diogo, R. 2003. Higher-level phylogeny of Siluriformes—an overview. In: Arratia, G.; Kapoor, B.G.; Chardon, M.; Diogo, R. (Eds.). *Catfishes*. EnWeld: Science Publishers. pp. 353-384.

Diogo, R. 2004. *Morphological evolution, adaptations, homoplasies, constraints, and evolutionary trends: Catfishes as a case study on general phylogeny and macroevolution*. EnWeld: Science Publishers. 502 p.

Dobson, D.M.; Dickens, G.R.; Rea, D.K. 2001. Terrigenous sediment on Ceara Rise: a Cenozoic record of South American orogeny and erosion. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 165: 215-229.

Drummond, A.J.; Ho, S.Y.W.; Phillips, M.J.; Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Public Library of Science Biology*, 4: 699-710.

Drummond, A.J.; Ho, S. Y.W.; Rawlence, N.; Rambaut, A. 2007. A rough guide to BEAST 1.4. Edinburgo: Universidade de Edinburgo. 41 p.

Drummond, A.J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.

Drummond, A.J. & Rambaut, A. 2009. Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. In: Lemey, P.; Salemi, M.; Vandamme, A-M (Eds). *The Phylogenetic Handbook: A practical approach to phylogenetics analysis and hypothesis testing*. 2.ed. Nova Iorque: Cambridge University Press. Cap. 18.

Duque, A.B. & Winemiller, K.O. 2003. Dietary segregation among large catfishes of the Apure and Arauca Rivers, Venezuela. *Journal of Fish Biology*, 63: 410-427.

Edwards, S.V. & Beerli, P. 2000. Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescent time in phylogeographic studies. *Evolution*, 54: 1839-1854.

Escobar, M.D. & Taphorn, C. 2006. Manejo de las poblaciones de bagres *Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. tigrinum* (Siluriformes, Pimelodidae) del Orinoco, a partir de análisis de variabilidad genética. *Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales*, 164: 79-100.

Esposti, M.D.; De Vries, S.; Crimi, M.; Ghelli, A.; Patarnello T.; Meyer, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et biophysica acta*, 26: 243-271.

Farias, I.P.; Ortí, G.; Sampaio, I.; Schneider, H.; Meyer, A. 2001. The cytochrome *b* gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution*, 53: 89-103.

Farias, I.P. & Hrbek, T. 2008. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 32-43.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17: 368-376.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

Felsenstein, J. 2004. *Inferring Phylogenies*. 1. ed. Sunderland: Sinauer Associates. 664 p.

Ferraris Jr., C.J. 2003. Genus and Species Incertae Sedis in Siluriformes. *In*: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 260.

Ferraris Jr., C.J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418: 1-628.

Fitch, W.M. 1970. Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic Zoology*, 19: 99-113.

Fjeldså, J. 1994. Geographical patterns for relict and young species of birds in Africa and South America and implications for conservation priorities. *Biodiversity and Conservation*, 3: 207-226.

Foster, P.G. & Hickey, D.A. 1999. Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 284-290.

Freeman, B.; Nico, L.G.; Osentoski, M.; Jelks, H.L.; Collins, T.M. 2007. Molecular systematics of Serrasalminae: deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. *Zootaxa*, 1-38.

Friesen, V. 2000. Introns. In: Baker, A.J. (Ed.). *Molecular Methods in Ecology*. Oxford: Blackwell. pp. 274-294.

Fu, Y-X & Li, W-H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693-709.

Fu, Y-X. & Li, W-H. 1999. Coalescing into the 21st century: an overview and prospects of coalescent theory. *Theoretical Population Biology*, 56: 1-10.

Gallo, H. & Díaz-Sarmiento, J. 2003. Variabilidad genética del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (pisces: Pimelodidae) en el Río Magdalena (Colombia). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 27: 599-606.

García, G.; Wlasiuk, G.; Lessa, EP. 2000. High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 129: 93-110.

Gayet, M. & Meunier, F.J. 1998. Maastrichtian to early late Paleocene freshwater Osteichthyes of Bolivia: additions and comments. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 85–110.

Gayet, M. & Meunier, F. J. 2003. Palaeontology and palaeobiogeography of catfishes. In: Arratia, G.; Kapoor, B.G.; Chardon, M.; Diogo, R. (Eds.). *Catfishes*. Enfield: Science Publishers. pp. 491-522.

Gibbs, A.K. & Brown, C.N. 1993. *The Geology of the Guiana Shield*. Oxford: Oxford University Press. 258 p.

Goulding, M. 1980. *The Fishes and the Forest, Explorations in Amazonian Natural History*. Berkeley: University of California Press. 280p.

Goulding, M.; Smith, N.J.H.; Mahar, D.J. 1996. *Floods of Fortune: Ecology and Economy along the the Amazon*. Nova Iorque: Columbia University Press. 193 p.

Goulding, M.J.; Barthem, R.; Ferreira, E. 2003. *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. Washington: Smithsonian Institution Press. 253 p.

Grande, T.; Laten, H.; López, J.A. 2004. Phylogenetic relationships of extant Esocid species (Teleostei: Salmoniformes) based on morphological and molecular characters. *Copeia*, 4: 743-757.

Gregory-Wodzicki, K.M. 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: a review. *Geological Society of America Bulletin*, 112: 1091-1105.

Guerrero, J. 1997. Stratigraphy, sedimentary environments and the Miocene uplift of the Colombian Andes. In: Kay, R.F.; Madden, R.H.; Cifelli, R.L.; Flynn, J.J. (Eds.).

*Vertebrate paleontology in the Neotropics: the miocene fauna of La Venta, Colombia.*  
Washington: Smithsonian Institution Press. pp. 15-43.

Hall, B.G. 2001. *Phylogenetic trees made easy: a how-to manual for molecular biologists.* 1.ed. Sunderland: Sinauer Associates. 180 p.

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

Hall, J.P. & Harvey, D.J. 2002. The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence from rionid butterflies. *Evolution*, 56: 1489-1497.

Haq, B.U.; Hardenbol, J.; Vail, P.R. 1987. Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science*, 235: 1156-1167.

Hardman, M. 2002. The phylogenetic relationships among extant catfishes, with special reference to Ictaluridae (Otophysi: Siluriformes). *Unpublished PhD. Dissertation.*  
Urbana: University of Illinois at Urbana-Champaign.

Hardman, M. & Page, L.M. 2003. Phylogenetic relationships among bullhead catfishes of the genus *Ameiurus* (Siluriformes: Ictaluridae). *Copeia*, 1: 20-33.

Hardman, M. 2004. The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome b and

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

Hardman, M. & Lundberg, J.G. 2006. Molecular phylogeny and a chronology of diversification for “phractocephaline” catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 410-418.

Hare, M.P. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 700-706.

Harpending, H.C.; Batzer, M.A.; Gurven, M.; Jorde, L.B.; Rogers, A.R.; Sherry, S.T. 1998. Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 1961-1967.

Harrison, R.G. 1998. Linking evolutionary pattern and process: the relevance of species concepts for the study of speciation. In: Howard, D.J. & Berlocher, S.J. (Eds.). *Endless Forms: species and speciation*. Nova Iorque: Oxford University Press. pp. 19-31.

Harris, S.E. & Mix, A.C. 2002. Climate and tectonic influences on continental erosion of tropical South America, 0-13 Ma. *Geology*, 30: 447-450.

Hassan, M.; Lemaire, C.; Fauvelot, C.; Bonhomme, F. 2002. Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. *Molecular Ecology Notes*, 2: 334-340.

Hastings, W.K. 1970. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika*, 57: 97-109.

He, M. & Haymer, D.S. 1997. Polymorphic intron sequences detected within and between populations of the Oriental fruit fly (*Diptera: Tephritidae*). *Annals of the Entomological Society of America*, 90: 825-831.

Hoelzer, G.A. 1997. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees revisited. *Evolution*, 51: 622-626

Horn, C. 1993. Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia: results of a palynostratigraphic study. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*, 105: 267–309.

Horn, C. 1994. An environmental reconstruction of the palaeo-Amazon River system (Middle–Late Miocene, NW Amazonia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*, 112: 187-238.

Horn, C.; Guerrero, J.; Sarmiento, G.A.; Llorente, M.A. 1995. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology*, 23: 237-240.

Hoorn, C. 1996. Miocene deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*, 273: 122-123.

Hrbek, T. & Larson, A. 1999. The evolution of diapause in the killfish family Rivulidae: a molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution* 53: 1200-1216.

Hrbek, T.; Farias, I.P.; Crossa, M.; Sampaio, I.; Porto, J.I.R.; Meyer, A. 2005a. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater Fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation*, 8: 297-308.

Hrbek, T.; Taphorn, D.C.; Thomerson, J.E. 2005b. Molecular phylogeny of *Austrofundulus* Myers (Cyprinodontiformes: Rivulidae), with revision of the genus and the description of four new species. *Zootaxa*, 825: 1-39.

Hubert, N. & Renno, J-F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33: 1414-1436.

Hubert, N.; Duponchelle, F.; Nuñez, J.; Garcia-Davila, C.; Paugy, D.; Renno, J-F. 2007. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus* : implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 16: 2115-2136.

Irion, G.; Müller, J.; Nunes de Mello, J.; Junk, W.J. 1995. Quaternary geology of the Amazonian lowland. *Geo-Marine Letters*, 15: 172-178.

IBAMA. 2007. Estatística da pesca 2007: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 113 p.

Irwin, D.M.; Kocher, T.D.; Wilson, A.C. 1991. Evolution of cytochrome b gene in mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 2: 13-34.

Jackson, S.T. 2004. Quaternary Biogeography: linking biotic responses to environmental variability across timescales. In: Lomolino, M.V. & Heaney, L.R. (Ed). *Frontiers of Biogeography: new directions in the geography of nature*. 1.ed. Londres: Cambridge University Press. Cap. 3

Jégu, M. & Keith, P. 1999. Lower Oyapock River as northern limit for the Western Amazon fish fauna or only a stage in its northward progression. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Series III, Sciences de la Vie*, 322: 1133-1143.

Jégu, M.; Keith, P.; Belmont-Jégu, E. 2002. Une nouvelle espèce de *Tometes* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae) du Bouclier Guyanais, *Tometes lebaili* n. sp. *Bulletin Français de la Pêche et de La Pisciculture*, 364: 23-48.

Jobb, G. 2008. *Treefinder version of October 2008*. Munique, Alemanha. Distributed by the author at [www.treefinder.de](http://www.treefinder.de).

Keith, P.; Nandrin, L.; Le Bail, P-Y. 2006. *Rivulus gaucheri*, a new species of rivuline (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from French Guiana. *Cybium*, 30: 133-137.

Kingman, J.F.C. 1982. The coalescent. *Stochastic Processes and their applications*. 13: 235-248.

Kishino, H. & Hasegawa, M. 1989. Evaluation of the maximum-likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *Journal of Molecular Evolution*, 29: 170-179.

Kishino, H.; Miyata, T.; Hasegawa, M. 1990. Maximum likelihood inference of protein phylogeny and the origin of chloroplasts. *Journal of Molecular Evolution*, 31: 151-160.

Klein, J.; Klein, D.; Figueiroa, F.; Sato, A.; O'huigin, C. 1997. Major Histocompatibility Complex genes in the studt of fish phylogeny. *In*: Kocher, T.D. & Stepien, C.A. (Eds). *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press. Cap 16.

Kocher, T.D.; Thomas, W.K.; Meyer, A.; Edwards, S.V.; Paabo, S.; Villablanca, F.X.; Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial-DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 6196-6200.

Kocher, T.D. & Stepien, C.A. 1997. *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press. 311p.

Kossowski, C. & Madrid, F. 1986. Ensayo de la reproducción inducida en bagre rayado cabezón *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus) 1766 (Pisces, Siluriformes). *Acta Científica Venezuela*, 36: 284-285.

Kuhner, M.; Yamato, J.; Felsenstein, J. 1998. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. *Genetics*, 149: 429-434.

Kumazawa, Y. & Nishida, M. 2000. Molecular phylogeny of Osteoglossoids: a new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1869-1878.

Ladoukakis, E.D. & Zouros, E. 2001. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 7: 1168-1175.

Langeani, F. 2003. Hemiodontidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Eds). *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 96-100.

Lavoué, S. & Sullivan, J.P. 2004. Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 171-185.

Lessa, E.P. 1992. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 323-330.

Li, C.; Ortí, G.; Zhang, G.; Lu, G. 2007. A practical approach to phylogenomics: the phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 44-54.

Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.

Lieberman, B.S. 2004. Range expansion, extinction and biogeographic congruence: a deep time perspective. In: Lomolino, M.V. & Heaney, L.R. (Eds.). *Frontiers of Biogeography: new directions in the geography of nature*. 1.ed. Londres: Cambridge University Press. Cap. 6.

Linnaeus, C. 1766. *Systema Naturae Sive Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, Cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*. 12. ed., Vol. 1, pt. 1. Laurentii Salvii, Holmiae. 532 p.

Liu, Z. & Herbert, T.D. 2004. High-latitude influence on the eastern equatorial Pacific climate in the early Pleistocene epoch. *Nature*, 427: 720-723.

Lomolino, M.V.; Riddle, B.R.; Brown, J.H. 2006. *Biogeography*. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates. 845 p.

López, J.A.; Chen, W.-J.; Ortí, G. 2004. Esociform phylogeny. *Copeia*, 3: 449–464.

Lopez, P.; Casane, D.; Philippe, H. 2002. Heterotachy, an important process of protein evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 1-7.

Losos, J.B. & Glor, R.E. 2003. Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 200-227.

Lovejoy, N.R.; Bermingham, E; Martin, A.P. 1998. Marine incursion into South America. *Nature*, 396: 421-422.

Lovejoy, N.R. & Araújo, M.L.G. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology*, 9: 259-268.

Lovejoy, N.R. & Collette, B.B. 2001. Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia*, 2: 324-338.

Lovejoy, N.R.; Albert, J.S.; Crampton, W.G.R. 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, 21: 5-13.

Loubens, G. & Aquim, J.L. 1986. *Sexualidad y Reproducción de los Principales Peces de la Cuenca del Río Mamoré, Beni-Bolivia*. Convenio Orstrom Corde-Beni.

Loubens, G. & Panfili, J. 2000. Biologie de *Pseudoplatystoma fasciatum* et *P. tigrinum* (Teleostei: Pimelodidae) dans le bassin du Mamoré (Amazonie Bolivienne). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 11: 13-34.

Lozano, A.P. 2005. Ciclo de vida e dinâmica populacional do caparari *Pseudoplatystoma tigrinum* Valenciennes 1840 (Pisces; Pimelodidae), no rio Apure, bacia do rio Orinoco. *Tese*. Manaus: INPA/UFAM. 225p.

Lowe-McConnell, R.H. 1964. The fishes of the Rupununi savanna districts of British Guinana, Part 1. Ecological groupings of fish species and effects of the seasonal cycle on the fish. *Journal of the Linnean Society (Zoology)*, 45: 103–144.

Lundberg, J.G. & McDade, L.A. 1986. A redescription of the rare Venezuelan catfish *Brachyrhamdia imitator* Myers (Siluriformes: Pimelodidae) with phylogenetic evidence for a large intrafamilial lineage. *Notulae Naturae, Academy of Natural Sciences, Philadelphia*, 463: 1-24.

Lundberg, J.G.; Mago-Leccia, G.F.; Nass, P. 1991. *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of *Pimelodidae* (Pisces: *Siluriformes*) from deep river channels of South America, and delimitation of the Subfamily Pimelodidae. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 104: 840-869.

Lundberg, J. G. 1997. Fishes of the Miocene La Venta fauna: additional taxa, biotic and paleoenvironmental implications. In: Kay, R.F.; Madden, R.H.; Cifelli, R.L.; Flynn, J.J.

(Ed.). *Vertebrate paleontology in the Neotropics: the Miocene fauna of La Venta*, Colombia. Washington: Smithsonian Institution Press. 592 p.

Lundberg, J.G. 1998. The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari R.P.; Lucena, Z.M.; Lucena, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 49-68.

Lundberg, J.G.; Marshall, L.G.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M.C.S.L.; Wesselingh, F. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.; Lucena, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 13–48.

Lundberg, J.G.; Kottelat, M.; Smith, G.R.; Stiassny, M.L.J.; Gill, A.C. 2000. So many fishes, so little time: An overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 87: 26-62.

Lundberg, J.G. & Aguilera, O. 2003. The late Miocene *Phractocephalus* catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from Urumaco, Venezuela: additional specimens and reinterpretation as a distinct species. *Neotropical Ichthyology*, 1: 97-109.

Lundberg, J.G. & Littmann, M.W. 2003. Family Pimelodidae (long whiskered catfishes). In: Reis, R.E. & Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Eds.). *Checklist of the freshwater fish of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 432–446.

Lundberg, J.G. 2005. *Brachyplatystoma promagdalenae*, new species, a fossil goliath catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Miocene of Colombia, South America. *Neotropical Ichthyology*, 3: 597-605.

Lydeard, C. & Roe, K.J. 1997. The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. In: Kocher, T.D. & Stepien, C.A. (Eds). *Molecular systematics of fishes*. Nova Iorque: Academic Press. pp. 285-303.

Malabarba, M.C.S.L. 1998. Phylogeny of fossil Characiformes and palaeobiogeography of the Tremembé formation, São Paulo, Brazil. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.; Lucena, C.A.S. (Eds). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 69–84.

Malvicini, L. & Llambías, E.J. 1982. El magmatismo Mioceno y las manifestaciones metalíferas asociadas en Argentina. Buenos Aires. *Actas V Congreso Latinoamericano de Geología Económica*, 3: 547–566.

Marques, F.P.L. 2000. Evolution of Neotropical freshwater stingrays and their parasites: taking into account space and time. Unpublished *Ph.D. Dissertation*. University of Toronto.

Marshall, L.G. & Lundberg, J.G. 1996. Technical comment: Miocene deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*, 273: 123-124.

- Martin, A.P. & Bermingham, E. 2000. Systematics and evolution of lower Central American cichlids inferred from analysis of cytochrome b gene sequence. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 9: 192-203.
- Martin, D.P.; Williamson, C.; Posada, D. 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics*, 21: 260-262.
- Matos, J.A. & Schaal, B.A. 2000. Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: a coalescent approach to hybridization. *Evolution*, 54: 1218-1233.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Nova Iorque: Columbia University Press. 372 p.
- McCauley, D.E. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 10: 198–202.
- McKittrick, M.C. & Zink, R.M. 1988. Species concept in Ornithology. *Condor*, 90: 1-14.
- Mello, P.H.; Venturieri, R.L.L.; Honji, R.M.; Moreira, R.G. 2009. Threatened fishes of the world: *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environmental Biology of Fishes*, 85: 359-360.

Menezes, N.A. 2003. Acestrorhynchidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America*, Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 231-233.

Metropolis, N.; Rosenbluth, A.; Rosenbluth, M.; Teller, A.; Teller, E. 1953. Equation of state calculations by fast computing machines. *Journal of Chemical Physics*, 21: 1087-1092.

Meyer, A. & Wilson, C. 1990. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *Journal of Molecular Evolution*, 31: 359–364.

Meyer, A. & Lydeard, C. 1993. The evolution of copulatory organs, internal fertilization, placentae and viviparity in killifishes (Cyprinodontiformes) inferred from a DNA phylogeny of the tyrosine kinase gene *x-src*. *Proceedings: Biological Sciences*, 254: 153-162.

Meyer, A. 1994. DNA technology and phylogeny of fish. In: Beaumont, A.R. (Ed). *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Londres: Chapman & Hall. pp 219-249.

Miller, K.G.; Kominz, M.A.; Browning, J.V.; Wright, J.D.; Mountain, G.S.; Katz, M.E.; Sugarman, P.J.; Cramer, B.S.; Christie-Blick, N.; Pekar, S.F. 2005. The phanerozoic record of global sea-level change. *Science*, 310: 1293-1298.

Miranda, M.O.T. & Ribeiro, L.P. 1997. Características Zootécnicas do Surubim. In: *Características Zootécnicas do Surubim*. Belo Horizonte: IBAMA. 43-56 p.

Montoya-Burgos, J.I.; Muller, S.; Weber, C.; Pawlowski, J. 1998. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 363-374

Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12: 1855–1867.

Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49: 718–726.

Moyer, G.R.; Burr, B.M.; Krajewski, C. 2004. Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140: 551–575.

Moyer, G.R.; Winemiller, K.O.; Mcphee, M.V.; Turner, T.F. 2005. Historical demography, selection, and coalescence of mitochondrial and nuclear genes in *Prochilodus* species of northern South America. *Evolution*, 59: 599–610.

Mueller, R.A. & MacDonald, G.J. 1995. Glacial cycles and orbital inclination. *Nature*, 377: 107-108.

Mullins, H.T.; Gardulski, A.F.; Wise, S.W.; Applegate, J. 1987. Middle Miocene oceanographic event in the eastern Gulf of Mexico: implications for seismic stratigraphic succession and Loop Current/Gulf Stream circulation. *Geological Society America Bulletin*, 98: 702–713.

Naylor, G.J.P.; Ryburn, J.A.; Fedrigo, O.; Lopez, J.A. 2005. Phylogenetic relationships among the major lineages of modern elasmobranchs. In: Hamlett, W.C. (Ed.). *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras*. EnWeld: Science Publishers. pp. 1-25.

Near, T.J.; Kassler, T.W.; Koppelman, J.B.; Dillman, C.B.; Philipp, D.B. 2003. Speciation in North American Black Basses, *Micropterus* (Actinopterygii: Centrarchidae). *Evolution*, 57: 1610-1621.

Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford: Oxford University Press. 333 p.

Nelson, G. & Platnick, N.I. 1981. *Systematics and Biogeography: Cladistics and Vicariance*. Nova Iorque: Columbia University Press. 567 p.

Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the World*. 4. ed. Nova Iorque: Wiley. 624 p.

Nichols, R. 2001. Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 358-364

Nielsen, R. & Slatkin, M. 2000. Likelihood analysis of ongoing gene flow and historical association. *Evolution*, 54: 44-50.

Niu, T.; Qin, Z.S.; Xu, X.; Liu, J.S. 2002. Bayesian haplotype inference for multiple linked single-nucleotide polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 70: 157-169.

Nixon, K. & Carpenter, J. 1993. On outgroups. *Cladistics*, 9: 413-426.

Nores, M. 1999. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *Journal of Biogeography*, 26: 475-485.

Nores, M. 2004. The implications of Tertiary and Quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. *Global Ecology and Biogeography*, 13: 149-161.

Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Britski, H.A.; Toledo-Filho, S.A. 1988. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Genetics and Molecular Biology*, 11: 577-624.

Ortí, G.; Hare, M.P.; Avise, J.C. 1997. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Molecular Ecology*, 6: 575-580.

Ortí, G. & Meyer, A. 1996. Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 556-573.

Palumbi, S.R. & Baker, C.S. 1994. Contrasting population structure from nuclear introns sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 426-435.

Palumbi, S.R. 1995. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis, D. & Moritz, C. (Eds.). *Molecular Systematics*. Sunderland: Sinauer Associates. pp. 205-247.

Palumbi, S.R.; Martin, A.; Romano, S.; McMillan, W.O.; Stice, L.; Grabowski, G. 2002. *The simple fool's guide to PCR: version 2*. Honolulu: University of Hawaii.

Pamilo, P. & Nei, M. 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5: 568-583.

Parker, A. 1997. Combining molecular and morphological data in fish systematics: examples from the Cyprinodontiformes. In: Kocher, T.D. & Stepien, C.A. (Eds). *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press. Cap. 11.

Patton, J.L.; Da Silva, M.N.F.; Malcolm, J.R. 1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution*, 48: 1314-1323.

Peng, Z.G.; He, S.P.; Zhang, Y.G. 2002. Mitochondrial cytochrome b sequence variations and phylogeography of the East Asian bagrid catfishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 12: 421-425.

Pennington, R.T.; Richardson, J.E.; Lavin, M. 2006. Insights into the historical construction of species-rich biomes from dated plant phylogenies, neutral ecological theory and phylogenetics community structure. *New Phytologist*, 172: 605-616.

Perdices, A.; Bermingham, E.; Montilla, A.; Doadrio, I. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 172-189.

Pereira, L.H.G.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2009. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. *Ecology of Freshwater Fish*, 18: 215-225.

Petry, P.; Bayley, P.B.; Markle, D.F. 2003. Relationships between fish assemblages, macrophytes and environmental gradients in the Amazon River floodplain. *Journal of Fish Biology*, 63: 547-579.

Phillips, R.B. & Oakley, T.H. 1997. Phylogenetic relationship among the salmonidae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. In: Kocher, T.D. & Stepien, C.A. (Eds). *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press. Cap. 10.

Pillans, B.; Chappell, J.; Naish, T.R. 1998. A review of the Milankovitch climatic beat:

template for Plio–Pleistocene sea-level changes and sequence stratigraphy. *Sedimentary Geology*, 122: 5-21.

Piper, D.J.; Pirmez, W.C.; Manley, P.L.; Long, D.; Flood, R.D.; Normark, W.R.; Showers, W. 1997. Mass transport deposits of Amazon Fan. *Proceedings Ocean Drilling Program Scientific Results*, 155: 109–146.

Platnick, N.I & Nelson, G. 1978. A method of analysis for historical biogeography. *Systematic Zoology*, 27: 1-16.

Posada, D. & Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

Posada, D. 2001. Unveiling the molecular clock in the presence of recombination. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1976-1978.

Potter, P.E. 1994. Modern sands of South America: composition, provenance and global significance. *Geologische Rundschau*, 83: 212-232.

Pretti, V.Q.; Calcagnotto, D.; Toledo-Piza, M.; Almeida-Toledo, L.F. 2009. Phylogeny of the Neotropical genus *Acestrorhynchus* (Ostariophysi: Characiformes) based on nuclear and mitochondrial gene sequences and morphology: a total evidence approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52: 312-320.

Quenouille, B.; Bermingham, E.; Planes, S. 2004. Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 66–88.

Rambaut, A. & Drummond, A.J. 2007. *Tracer* v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Rambaut, A. 2009. FigTree v.1.2.2. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.

Räsänen, M.E.; Salo, J.S.; Kalliola, R. 1987. Fluvial perturbation in the western Amazon basin: regulation by long-term sub-Andean tectonics. *Science*, 238: 1398-1401.

Räsänen, M.E.; Salo, J.S.; Jungner, H.; Pittman, L.R. 1990. Evolution of the western Amazon lowland relief: impact of Andean foreland dynamics. *Terra Nova*, 2: 320-332.

Räsänen, M.E.; Neller, R.; Salo, J.S.; Jungner, H. 1992. Recent and ancient fluvial deposition systems in the Amazonian foreland basin, Peru. *Geological Magazine*, 129: 293-306.

Räsänen, M.E.; Linna, A.M.; Santos, J.C.R.; Negri, F.R. 1995. Late Miocene tidal deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*, 269: 386-390.

Reeves, R.G. & Bermingham, E. 2006. Colonization, population expansion, and lineage turnover: phylogeography of Mesoamerican characiform fish. *Biological Journal of the Linnean Society*, 88: 235–255.

Reid, S. 1983. La biología de los bagres rayados *Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. tigrinum* en la cuenca del Río Apure, Venezuela. *Revista Unellez Ciencia y Tecnología*, 1: 13-41.

Reis, R.E. 1998. Systematics, biogeography, and the fossil record of the Callichthyidae: a review of the available data. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.; Lucena, C.A.S. (Eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 351-32.

Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. 2003. Introduction. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Eds.). *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 1-3.

Renno, J.F.; Berrebi, P.; Boujard, T.; Guyomard, R. 1990. Intraspecific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in French-Guiana and Brazil — a genetic approach to the refuge theory. *Journal of Fish Biology*, 36: 85-95.

Renno, J.-F.; Hubert, N.; Torrico, J.P.; Duponchelle, F.; Nunez Robriguez, J.; Garcia Davila, C.; Willis, S.C.; Desmarais, E. 2006. Phylogeography of peacock bass *Cichla monoculus* in the upper Madeira (Amazon, Bolivia): evidence of incipient speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 503-510.

- Revaldaves, E.; Pereira, L.H.G.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, 5: 463-465.
- Reyes, A. & Huq, M.F. 1990. Algunos aspectos reproductivos del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766 (Pices, Pimelodinae) en la laguna Grande, Maturin, Venezuela. *Boletín Instituto Oceanográfico*, 29: 133-140.
- Ribeiro, A.C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4: 225-246.
- Řičan, O. & Kullander, S.O. 2006. Character- and tree-based delimitation of species in the '*Cichlasoma*' *facetum* group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. *Journal of Zoological Systematics*, 44: 136-152.
- Rice, A.H. 1921. The Rio Negro, the Casiquiare Canal, and the Upper Orinoco, September 1919-April 1920. *The Geographic Journal*, 58: 321-343.
- Rojas, M.; Olivera, R.; Quispe, R.; Ortega, H. 2007. Estudio preliminar de ictioplancton de la Amazonia peruana con énfasis en la familia Pimelodidae. *Revista Peruana de Biología*, 13: 263-265.

Rosa, R.S.; Carvalho, M.R.; Wanderley, C.A. 2008. *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of Neotropical freshwater stingray from Surinam. *Neotropical Ichthyology*, 6:1-8.

Rozen, S. & Skaletsky, H.J. 2000. PRIMER 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. & Misener, S. (Ed.) *Bioinformatics Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press. p. 365–386.

Ruffino, M.L. & Isaac, V.J. 1999. Dinâmica populacional do surubim-tigre, *Pseudoplatystoma tigrinum* (Valenciennes, 1840), no médio Amazonas (Siluriformes, Pimelodidae). *Acta Amazonica*, 29: 463-476.

Ruffino, M.L.; Barthem, R.B.; Fischer, C.F.A. 2000. Perspectivas do manejo dos bagres migradores na Amazônia. IBAMA. Coleção Meio Ambiente. Série Estudos Pesca, 22: 141-152.

Rull, V. 2008. Speciation timing and Neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology*, 17: 2722-2729.

Rutherford, S. & D'Hondt, S. 2000. Early onset and tropical forcing of 100.000-year Pleistocene glacial cycles. *Nature*, 408: 72-75.

Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.

Sanderson, M.J. 1998. Estimating rate and time in molecular phylogenies: beyond the molecular clock? In: Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Doyle, J.J. (Eds.). *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers. pp. 242-264.

Sanderson, M. J. 2002. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 101-109.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467.

Schaefer, S.A. 1997. The Neotropical cascudinhos: systematics and biogeography of the *Otocinclus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 148: 1-120.

Schaefer, S.A. 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical Cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 363–374.

Schierup, M.H. & Hein, J. 2000. Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis. *Genetics*, 156: 879-891.

Schmidt, H.A. & Haeseler, A.V. 2009. Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. In: Lemey, P.; Salemi, M.; Vandamme, A-M. *The Phylogenetic Handbook: A practical approach to phylogenetics analysis and hypothesis testing*. 2. ed. Nova Iorque: Cambridge University Press. Cap. 6.

Schneider, H. 2003. *Métodos de análise filogenética: um guia prático*. 2. ed. Ribeirão Preto: Editora Holos. 118 p.

Sekine, E.S; Prioli, A.J.; Prioli, S.M.A.P.; Júlio Jr., H.F. 2002. Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaira Falls in the Paraná River. *Acta Scientiarum*, 24: 507-512.

Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H.; Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701.

Shapiro, B.; Rambaut, A.; Drummond, A.J. 2006. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 7-9.

Shibatta, O. 1998. A sistemática e evolução da família Pseudopimelodidae (Ostariophysi, Siluriformes), com a revisão taxonômica de gênero *Pseudopimelodus*. *Tese*. São Carlos: Universidade Federal São Carlos.

Shibatta, O. 2003. Family Pseudopimelodidae (Bumblebee catfishes, dwarf marbled catfishes). In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 406–410.

Shimodaira, H. & Hasegawa, M. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1114–1116.

Shimodaira, H. 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Systematic Biology*, 51: 492-508.

Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Ortí, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407-417.

Sousa, A.B. 2003. Análise da variabilidade genética do surubim do São Francisco, *Pseudoplatystoma coruscans* (Pisces, Pimelodidae): subsídios à conservação e ao cultivo da espécie. *Tese*. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos.

Spix, J.B. von & Agassiz, L. 1829. *Selecta Genera et Species Piscium Quos in Itinere per Brasiliam Annos MDCCCXVII–MDCCCXX Jussu et Auspiciis Maximiliani Josephi I...Colleget et Pingendo Curavit* Dr. J. B. Spix Monachii. xvi + ii + 82 pp., 48 pl.

Stace, C.A. 1989. Dispersal versus vicariance: no context. *Journal of Biogeography*, 16: 200-201.

Stephens, M.; Smith, N.J.; Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68: 978-989.

Stephens, M. & Donnelly, P. 2003. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction. *American Journal of Human Genetics*, 73: 1162-1169.

Stephens, M.; Smith, N.J.; Donnelly, P. 2004. Documentation for PHASE, version 2.1 Available from <http://www.stat.washington.edu/stephens>.

Stock, D.W. & Whitt, G.S. 1992. Evidence from 18S ribosomal RNA sequences that lampreys and hagfishes form a natural group. *Science*, 257: 787-789.

Strange, R.M. & Burr, B.M. 1997. Intraspecific phylogeography of North American highland fishes: A test of the Pleistocene vicariance hypothesis. *Evolution*, 51: 885-897.

Strimmer, K. & Rambaut, A. 2002. Inferring confidence sets of possibly misspecified gene trees. *Proceedings of the Royal Society B*, 269: 137-142.

Sullivan, J.P.; Lavoué, S.; Hopkins, C.D. 2000. Molecular systematics of the African electric fishes (Mormyroidea: Teleostei) and a model for the evolution of their electric organs. *Journal of Experimental Biology*, 203: 665-683.

Sullivan, J.P.; Lundberg, J.G.; Hardman, M. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 636-662.

Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199-203.

Swarça, A.C.; Caetano, L.C.; Dias, A.L. 2000. Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 23: 589-593.

Swarça, A.C.; Fenocchio, A.A.; Cestari, M.M.; Dias, A.L. 2005. Karyotype divergence among populations of giant catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Pimelodidae) indicates higher species diversity. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 16: 325-330.

Swofford, D.L. & Olsen, G.J. 1996. Phylogenetic reconstruction. In: Hillis, D.M.; Moritz, C.; Mable, B. (Eds.). *Molecular Systematics*. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates. Cap. 11.

Synetos, D.; Dabeva, M.D.; Warner, J.R. 1992. The Yeast Ribosomal Protein S7 and Its Genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 3008-3013.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.

Templeton, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397.

Teugels, G.G. 1996. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an overview. *Aquatic Living Resources*, 99-34.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibron, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22: 4673-4680.

Thorne, J.L. & Kishino, H. 2002. Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data. *Systematic Biology*, 51: 689-702.

Toledo-Pizza, M.; Menezes, N.A.; Dos Santos, G.M. 1999. Revision of the Neotropical fish genus *Hydrolycus* (Ostariophysi: Cynodontidae) with the description of two new species. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 10: 255-280.

Todd, J.H. 1983. The chemical language of fishes. *Scientific American*, 224: 99-108

Torrico, J.P.; Hubert, N.; Desmarais, E.; Duponchelle, F.; Nuñez Rodriguez, J.; Montoya-Burgos, J.; Garcia Davila, C.; Carvajal-Vallejos, F.M.; Grajales, A.A.; Bonhommed, F.; Renno, J.-F. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51: 588-594

Turner, T.F.; McPhee, M.V.; Campbell, P.; Winemiller, K.O. 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology*, 64: 186-201.

Uliana, M.A. & Biddle, K.T. 1988. Mesozoic-Cenozoic paleogeographic and geodynamic evolution of southern South America. *Revista Brasileira de Geociências*, 18: 172–190.

Vail, P.R. & Hardenbol, J. 1979. Sea-level changes during the Tertiary. *Oceanus*, 22: 71-80.

Valderrama, M.; Zarate, M.; Vera, G.; Moreno, C.; Caraballo, P.P.; Martinez, J. 1988. Determinación de la talla media de madurez y análisis de la problemática con referencia

a las tallas medias de captura del bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) Linnaeus 1766 (Pisces: Pimelodidae) en la cuénca del Río Magdalena, Colombia. *Revista Trianea Acta Científica Técnica Inderena*, 2: 537-549.

Valentincic, T.B. & Caprio, J. 1994. Chemical and visual control of feeding and escape behaviors in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Physiology & Behavior*, 55: 845-855

Vari, R.P. 1982. Systematics of the Neotropical Characoid genus *Curimatopsis* (Pisces: Characoidei). *Smithsonian Contribution to Zoology*, 373: 1-28.

Vari, R.P. 1984. Systematics of the Neotropical characiform genus *Potamorhina* (Pisces: Characiformes). *Smithsonian Contribution to Zoology*, 400: 1-36.

Vari, R.P. 1988. The Curimatidae, a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetics biogeography. In: Vanzolini, P.E. & Ronald Heyer, W. (Eds). *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciencias. pp. 343-377.

Vari, R.P. 1989a. Systematics of the Neotropical characiform genus *Curimata* Bosc (Pisces, Characiformes). *Smithsonian Contribution to Zoology*, 474: 1-63.

Vari, R.P. 1989b. Systematics of the Neotropical characiform genus *Psectrogaster* Eigenmann and Eigenmann (Pisces, Characiformes). *Smithsonian Contribution to Zoology*, 481: 1-43.

Vari, R.P. & Weitzman, S.H. 1990. A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America. In: Peters, G. & Hutterer, R. (Eds). *Vertebrates in the tropics*. Bonn: Proceedings of the International Symposium on Vertebrate Biogeography and Systematics in the Tropics, Alexander König Zoological Museum. pp. 381-393.

Vari, R.P. 1991. Systematics of the Neotropical characiform genus *Steindachnerina* Fowler (Pisces, Characiformes). *Smithsonian Contribution to Zoology*, 507: 1-118.

Vari, R.P. 1992. Systematics of the Neotropical characiform genus *Cyphocharax* Fowler (Pisces, Characiformes). *Smithsonian Contribution to Zoology*, 529: 1-137.

Vari, R.P. 1995. The Neotropical characiform fish family Ctenoluciidae (Teleostei: Ostariophysi): supra and intrafamilial phylogenetic relationships, with a revisionary study. *Smithsonian Contribution to Zoology*, 564: 1-97.

Vari, R.P.; Castro, R.M.C; Raredon, S. 1995. The Neotropical fish family Chilodontidae (Teleostei: Characiformes): a phylogenetics study and a revision of *Caenotropus* Günther. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 577: 1-32.

Vari, R.P. & Malabarba, L.R. 1998. Neotropical ichthyology: an overview. In: Malabarba, L.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S.; Lucena, Z.M.S. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 1-11.

Vari, R.P. & Harold, A.S. 2001. Phylogenetic study of the Neotropical fish genera *Creagrutus* Günther and *Piabina* Reinhardt (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), with a revision of the cis-Andean species. *Smithsonian Contribution to Zoology*, 613: 1-239.

Vega, A.M.L. 2007. Reconstituição paleoambiental dos depósitos Miocenos na região centro-oriental da Bacia do Solimões, Amazonas. *Geociencias*. Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil, p. 92.

Vonhof, H.B.; Wesselingh, F.P.; Ganssen, G.M. 1998. Reconstruction of the Miocene western Amazonian aquatic system using molluscan isotopic signatures. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*, 141: 85-93.

Vonhof, H.B.; Wesselingh, F.P.; Kaandorp, R.J.G.; Davies, G.R.; van Hinte, J.E.; Guerrero, J.; Räsänen, M.; Romero-Pittman, L.; Ranzi, A. 2003. Paleogeography of Miocene Western Amazonia: Isotopic composition of molluscan shells constrains the influence of marine incursions. *Geological Society of America Bulletin*, 115: 983-993.

Zamudio, K.R. & Greene, H.W. 1997. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for Neotropical biogeography, systematics, and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 62: 421-442.

Zardoya, R. & Doadrio, I. 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution*, 49: 227-237.

Zhang, D. & Hewitt, G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12: 563-584.

Zuanon, J.A.S. 1999. História natural da ictiofauna de corredeiras do rio Xingú, na região de Altamira, Pará. Biology. *Tese*. Campinas: Universidade de Campinas. 190 p.

Wakeley, J. & Hey, J. 1997. Estimating ancestral population parameters. *Genetics*, 145: 847-855.

Wang, R.L.; Stec, A.; Hey, J.; Lukens, L.; Doebley, J. 1999. The limits of selection during maize domestication. *Nature*, 398: 236-239.

Waters, J.M.; Rowe, D.L.; Apte, S.; King, T.M.; Wallis, G.P.; Anderson, L.; Norris, R.J.; Craw, D.; Burrige, C.P. 2007. Geological dates and molecular rates: rapid divergence of rivers and their biotas. *Systematic Biology*, 56: 271-282.

Weitzman, S.H. & Weitzman, M.J. 1982. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. In: Prance, G.T. (Ed.). *Biological Diversification in the Tropics*. Nova Iorque: Columbia University Press. pp. 403-422.

Weitzman, S.H. & Malabarba, L.R. 1998. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.; Lucena, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 161-170.

Weitzman, M.J. & Weitzman, S.H. 2003. Lebiasanidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America* (Eds). Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 241-251.

Wesselingh, F.P.; Räsänen, M.E.; Irion, G.; Vonhof, H.B.; Kaandorp, R.; Renema, W.; Pittman, L.R.; Gingras, M. 2002. Lake Pebas: a palaeoecological reconstruction of a Miocene, long-lived lake complex in western Amazonia. *Cainozoic Research*, 1: 35-81.

Wesselingh, F.P. 2006. Molluscs from the Miocene Pebas formation of Peruvian and Colombian Amazonia. *Scripta Geologica*, 133: 19-290.

Wesselingh, F.P. & Salo, J.A. 2006. Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. *Scripta Geologica*, 133: 439-458.

Wiley, E.O. 1981. *Phylogenetics: the theory and practice of Phylogenetic Systematics*. Nova Iorque: Wiley-Interscience. 456p.

Wiley, E.O. 1988. Vicariance Biogeography. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19: 513-542.

Willis, S.C.; Nunes, M.S.; Montaña, C.G.; Farias, I.P.; Lovejoy, N.R. 2007. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 291-307.

Willis, S.C.; Nunes, M.S.; Montaña, C.G.; Farias, I.P.; Ortí, G.; Lovejoy, N.R. 2010. The Casiquiare river acts as a corridor between the Amazonas and Orinoco river basins: biogeographic analysis of the genus *Cichla*. *Molecular Ecology*, 19: 1014-1030.

Winemiller, K.O.; López-Fernández, H.; Taphorn, D.C.; Nico, L.; Barbarino-Duque, A. 2008. Fish assemblages of the Casiquiare River, a corridor and zoogeographical filter for dispersal between the Orinoco and Amazon basins. *Journal of Biogeography*, 35: 1551-1563.

Yang, Z. 2006. *Computational Molecular Evolution*. Oxford: Oxford University Press. 357 p.