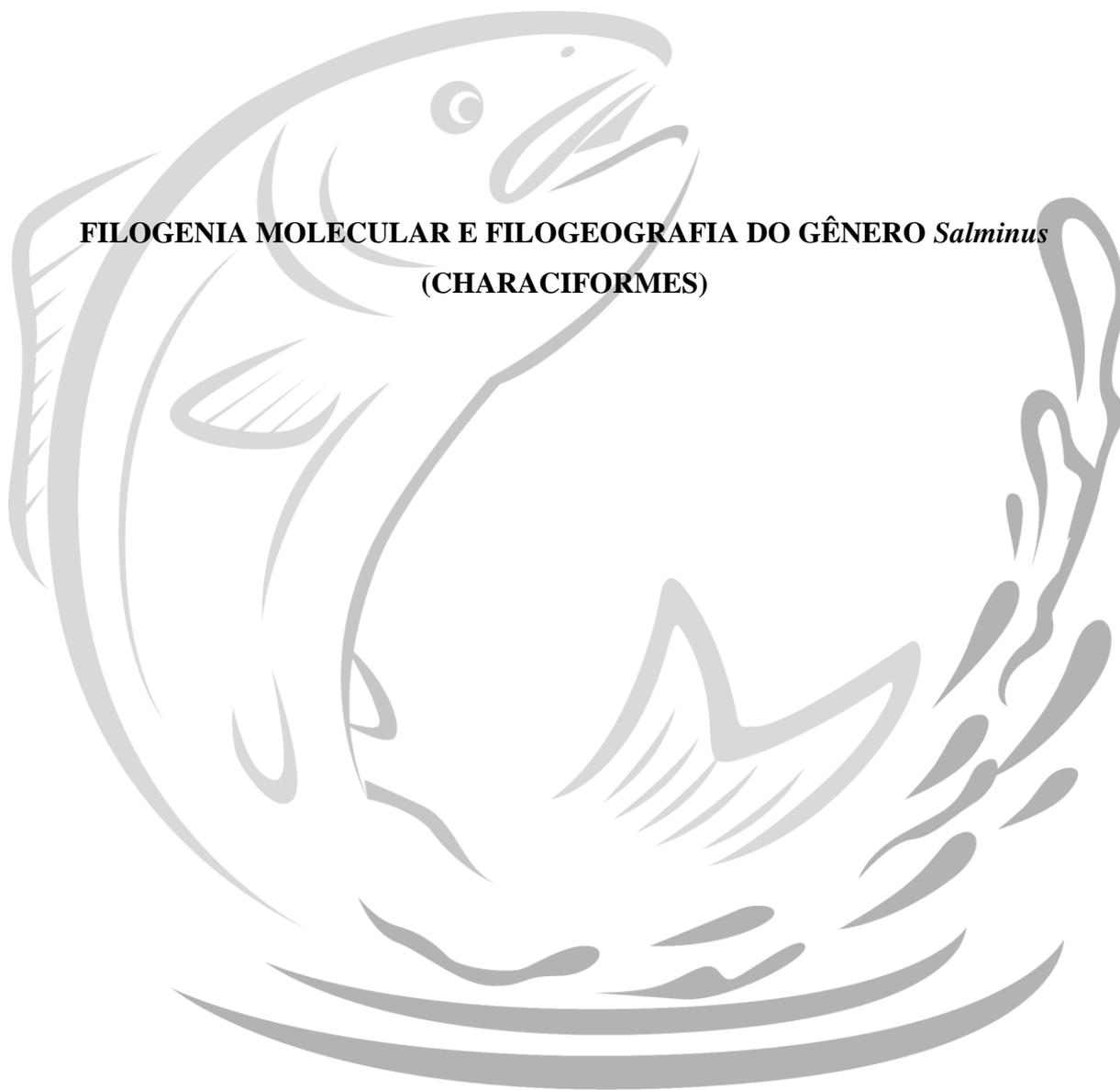


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**CAROLINA DE BARROS MACHADO DA SILVA**

**FILOGENIA MOLECULAR E FILOGEOGRAFIA DO GÊNERO *Salminus*  
(CHARACIFORMES)**



**SÃO CARLOS**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**CAROLINA DE BARROS MACHADO DA SILVA**

**FILOGENIA MOLECULAR E FILOGEOGRAFIA DO GÊNERO *Salminus***  
**(CHARACIFORMES)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Genética e Evolução  
Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.

**SÃO CARLOS**

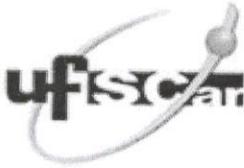
**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586f Silva, Carolina de Barros Machado da  
Filogenia molecular e filogeografia do gênero  
Salminus (Characiformes) / Carolina de Barros  
Machado da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
161 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2016.

1. Abordagem ABC. 2. América do Sul. 3.  
Biogeografia. 4. DNA barcoding. 5. GMYC. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Carolina de Barros Machado da Silva, realizada em 30/09/2016:

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior  
UFSCar

Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes  
UFSCar

Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo  
UFSCar

Prof. Dr. Cláudio Oliveira  
UNESP

Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres  
UFPE

Dedico à minha família, Paulo (Painho),  
Rosana (Mainha), Paula e Mariana, por  
estarem sempre ao meu lado nessa jornada!  
E a David, pelo apoio incondicional.  
Agradeço a eles todo amor e carinho  
recebido.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, renovado após cada provação que se apresenta e nos sonhos que se concretizaram, pela oportunidade de aprender e conviver com pessoas tão especiais e, principalmente, por iluminar meus caminhos mais escuros.

Aos meus pais, Paulo e Rosana, e minhas irmãs, Paula e Mariana, que, com muito amor, carinho, compreensão e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Ao meu namorado David, por estar comigo desde o primeiro dia em que essa etapa se iniciou e pelo incentivo incondicional para que grandes momentos desse Doutorado fossem concretizados. Obrigada pelo amor, suporte, amizade e pelo Logan.

À Universidade Federal de São Carlos, através do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv), pela oportunidade concedida e formação acadêmica. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ambos pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento para o aperfeiçoamento profissional no exterior.

Ao professor Pedro Manoel Galetti Junior por ter aceitado encontrar com uma desconhecida (eu!) em João Pessoa e, sem saber nada sobre mim, ter tido a coragem de apostar que eu vestiria a camisa do LabBMC. Obrigada por ter dito que “iríamos fazer um lindo trabalho” quando passei na seleção. Essa confiança fez uma grande diferença! Agradeço muito pela orientação, incentivo e pela autonomia para desenvolver esse projeto. Tenha certeza que o meu crescimento profissional nesse ambiente foi estrondoso.

À professora Ana Carolina Carnaval, pelo acolhimento e atenção durante todo meu período de intercâmbio na City College of New York, NYC, NY, EUA. Muito obrigada pelas valiosas contribuições intelectuais e canetadas, muitas vezes assustadoras, em minhas produções científicas. Com certeza esses ensinamentos jamais serão esquecidos.

I'm grateful to all The Carnaval Lab members for the wonderful company. Thanks for the help on data analyses, the discussions about my project, and the happy hours at the Grill on the Hill. Thank you for being so dedicated to make me happy. Ivan, Peter, Maria, Dani and Esmeralda, thank you guys for the friendship.

Aos meus amigos de faculdade Brunão, Bruninho, Dani, Laura e Mi que apesar da falta de tempo ou da grande distância física entre nós, sempre se fizeram presentes pelo

*whatsapp* ou pela “thread eterna”. A vocês agradeço por tudo que vivi e me tornei nos últimos anos.

À “equipe”, Hugo, Janaína, Kellen e Ruthanna, por serem grandes amigos e não permitirem que eu me desconecte de Recife. Obrigada pelos carnavais, pelo Mercado e pelos sushis. Agradeço até por entenderem quando o ônibus São Carlos-Conde da Boa Vista atrasa e eu perco os compromissos. Principalmente, agradeço a Ruthanna por mais de 17 anos de amizade. Amiga...obrigada por me ensinar o significado de uma amizade leve e tranquila.

Ao Laboratório de Genética Legal, mesmo sem termos contato, agradeço a todos pelo apoio para que eu pudesse realizar voos mais altos! O carinho e as boas lembranças que tive com vocês durante a graduação e o mestrado permanecerão sempre vivos.

Ao Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação, sem nomeações, afinal ao longo de 4 anos muitas pessoas passaram por aqui e com certeza esquecerei alguém. Agradeço a todos vocês por me fazer crescer profissionalmente, pela ajuda na hora de pensar em como discutir esse trabalho, pelos almoços e confraternizações. Um agradecimento especial a Jorge, por trazer amostras para mim lá de onde o vento faz a curva e pelas discussões fantásticas para construção desse trabalho e do meu pensamento crítico. A Ueslei, pelo apoio, amizade, companhia até tarde no laboratório, e pela grande ajuda de bancada enquanto estava fora do país. Aos demais, obrigada pela presença nesta fase da minha vida.

Muito obrigada a todos!

“We cannot solve our problems  
with the same thinking we used  
when we created them”

Albert Einstein

## RESUMO

*Salminus* é um gênero constituído por quatro espécies de peixes Neotropicais de médio e grande porte, predadores topo de cadeia, que possuem importância na pesca comercial e esportiva. Escassez de informações quanto a taxonomia, filogenia e filogeografia, dificultam medidas de conservações adequadas para o gênero, que se encontra em acentuado declínio populacional. Por essa razão, este estudo objetivou, através do emprego de marcadores moleculares mitocondriais (COI, Cytb e D-loop) e nucleares (RAG2 e íntron do S7), elucidar incertezas taxonômicas, identificar diversidade críptica, investigar as relações filogenéticas entre as espécies e inferir os processos históricos que modelaram a distribuição atual do gênero *Salminus*. Para auxiliar nas questões taxonômicas, nós empregamos análise de DNA *barcoding* tradicional e GMYC utilizando o marcador COI em 110 espécimes, representando as quatro espécies válidas. Em ambas metodologias, oito MOTUs (unidades taxonômicas operacionais moleculares) foram identificadas. Apenas duas espécies, *Salminus affinis* e *Salminus franciscanus*, apresentaram uma única MOTU cada. As espécies *Salminus brasiliensis* e *Salminus hilarii* foram representadas por duas e quatro MOTUs, respectivamente. Essas MOTUs estão distribuídas em distintas bacias hidrográficas onde polimorfismos morfológicos já haviam sido descritos. As médias das distâncias intraespecíficas superiores ao *threshold* ótimo de 1.1% (*S. brasiliensis* – 3.6%, e *S. hilarii* – 5%), reforçam a ideia de mais unidades taxonômicas em *Salminus*. A análise *multiloci* recuperou informações interessantes quanto à diversidade críptica: as linhagens mitocondriais parafiléticas de *S. brasiliensis*, uma proveniente do Alto rio Paraná e outra formada por espécimes das demais regiões da bacia Platina, formaram um único grupo monofilético. Para *S. hilarii*, apesar de quatro MOTUs observadas, apenas três foram recuperadas. Portanto, baseada na análise *multiloci* e no conceito filogenético de espécie, propomos um novo cenário taxonômico para *Salminus*. O gênero passa a ser constituído por seis espécies: *S. affinis*, *S. franciscanus*, *S. brasiliensis*, *S. hilarii*, *Salminus* sp. Amazonas e *Salminus* sp. Araguaia. A filogenia recriada refutou hipóteses previamente propostas. *S. affinis*, única espécie transandina, foi a espécie-irmã dos demais *Salminus*, que formam dois grandes grupos: grupo Noroeste, constituído por *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*, e grupo Sudeste, composto por *S. brasiliensis*, *S. franciscanus* e *S. hilarii*. Os processos de divergência entre as espécies do gênero se iniciou no Mioceno Superior e está associada a eventos de vicariância e geodispersão que modelaram a paisagem hidrogeológica nos últimos 12 milhões de anos. Pela primeira vez, foi utilizado uma abordagem baseada em modelos para testar cenários

biogeográficos alternativos e distinguir se existem assinaturas filogeográficas entre os eventos responsáveis pelo processo de diversificação de peixes Neotropicais. Nós evidenciamos que distintas assinaturas filogeográficas entre vicariância e geodispersão puderam ser detectadas em nosso modelo biológico. A clara designação das espécies por si só já acarreta em uma informação valiosa para conservação, afinal seis unidades biológicas precisam ser protegidas. Como essas espécies estão localizadas em distintas bacias hidrográficas, cada bacia passa ser avaliada como uma unidade biogeográfica importante para a manutenção dos processos evolutivos e ecológicos que sustentam a diversidade e permanência das espécies.

**Palavras chaves:** Abordagem ABC; América do Sul, Biogeografia; DNA *barcoding*; GMYC; Unidades Evolutivas Significativas.

## ABSTRACT

*Salminus* is a genus comprised of four Neotropical medium- and large-sized fishes species, top predators, with both recreational and commercial importance. The paucity of information on taxonomy, phylogeny and phylogeography make appropriate conservation policies difficult for the genus, which is in a significant population decline. For this reason, our goal was, by using mitochondrial (COI, Cytb and D-loop) and nuclear (RAG2 and S7 intron) molecular makers, to elucidate taxonomic uncertainties, identify cryptic diversity, investigate the phylogenetic relationship among the species and infer the historical processes that shaped the current *Salminus* distribution. To assist in taxonomic issues, we employed the traditional DNA barcoding and GMYC COI-based analyses in 110 specimens, representing the four valid species. In both methodologies, eight MOTUs (molecular operational taxonomic units) were identified. Only two species, *Salminus affinis* and *Salminus franciscanus*, represented a MOTU each. The species *Salminus brasiliensis* and *Salminus hilarii* were represented by two and four MOTU, respectively. These MOTUs are distributed in distinct hydrographic basins where morphological polymorphisms had already been described. The average intraspecific distances greater than the optimal threshold of 1.1% (*S. brasiliensis* – 3.6%, e *S. hilarii* – 5%), reinforce the idea of more taxonomic units in *Salminus*. The multiloci analysis recovered interesting information about the cryptic diversity: the paraphyletic mitochondrial lineages of *S. brasiliensis*, one from Upper Paraná river and another composed of specimens from the other regions of the Platina basin, formed a unique monophyletic group. For *S. hilarii*, despite the four MOTUs observed, only three of them were recovered. Therefore, based on multiloci analysis and phylogenetic species concept, we proposed a new taxonomic scenario for *Salminus*. The genus is now composed of six species: *S. affinis*, *S. franciscanus*, *S. brasiliensis*, *S. hilarii*, *Salminus* sp. Amazonas and *Salminus* sp. Araguaia. The phylogeny reconstruction refuted hypotheses previously proposed. *S. affinis*, the only trans-Andean species, was the sister species of the other *Salminus*, which formed two main groups: Northwest group, composed of *S. sp. Amazonas* and *S. sp. Araguaia*, and Southeast group, formed by *S. brasiliensis*, *S. franciscanus* and *S. hilarii*. The divergence processes among *Salminus* began in Later Miocene and it is associated with vicariance and geodispersal events that shaped the hydrological landscape in the past 12 million years. For the first time, it was used a model-based approach in order to test alternative biogeographic scenarios and to distinguish phylogeography signatures among the events responsible for Neotropical fishes' diversification. We evidenced that the distinct vicariance and geodispersal signatures could

be detected in our biological model. A clear description of these species brings in a valuable information for conservation, because, now, six biological units need to be protected. As these species are located in distinct hydrographic basins, each basin becomes one important biogeographic unit to maintain the evolutionary and ecological processes that sustain the species permanence and diversity.

**Key words:** ABC approach; Biogeography; DNA barcoding; Evolutionary Significant Units; GMYC; South America.

## LISTA DE FIGURAS

Página

### Fundamentação Teórica

- Figura 1** Características geológicas e topográficas da Placa sul-americana. As letras representam alguns dos principais arcos estruturais da América do Sul: (a) Arco de Gurupa, (b) Arco de Purus, (c) Arco de Vaupes e (d) Arco de Michicola. As setas vermelhas indicam o sentido de deslocamento das placas tectônicas (Modificado de LUNDBERG et al., 1998). **23**
- Figura 2** Estimativas no nível do mar derivadas a partir de Nova Jérsei (EUA) que providenciam um registro global para os últimos 100 Ma e como interferiram na paisagem hidrológica sul-americana entre 83 – 60 Ma. As diferentes cores representam as fontes bibliográficas de onde os dados foram retirados: laranja – Kominz et al. (2008) azul – Miller et al. (2005) e roxo – Lisiecki e Raymo (2004). Modificado a partir de Miller et al. (2011). **25**
- Figura 3** Distribuição geográfica das espécies de *Salminus*. (A) *Salminus affinis*. (B) *Salminus brasiliensis*. (C) *Salminus hilarii*. (D) *Salminus franciscanus*. As cores representam as diferentes bacias hidrográficas sul-americanas. **32**
- Figura 4** Relações intragenéricas entre as espécies de *Salminus*, (A) baseadas em dados moleculares (ABE et al., 2014) e (B) dados morfológicos (LIMA, 2006). **34**

### Capítulo 1

- Figura 1** Bacias hidrográficas onde ocorrem as espécies de *Salminus* e os locais **83**

de coleta (símbolos amarelos): (1.1) *Salminus affinis*, círculos; (1.2) *Salminus brasiliensis*, quadrados; (1.3) *Salminus hilarii*, triângulos; e (1.4) *Salminus franciscanus*, estrelas.

- Figura 2** Topologias derivadas de duas abordagens de delimitações de espécies baseadas em 136 sequências COI de *Salminus*. (2.1) DNA *barcoding* tradicional: topologia de NJ com valores de *bootstrap* localizados acima dos ramos. (2.2) Topologia de IB com probabilidades posteriores. A barra vertical cinza indica o único ponto de transição entre os processos de especiação/extinção e coalescência, com máximo valor de verossimilhança. Apenas probabilidade maiores que 80% foram representadas. Ambas topologias foram construídas com sequências do banco de dados da BOLD (espécimes FUPR, BSB e FARGB) e as sequências produzidas neste trabalho; Símbolos representam as quatro espécies nominais: *S. affinis* (círculo), *S. brasiliensis* (quadrado), *S. franciscanus* (estrela) e *S. hilarii* (triângulo). **84**
- Figura 3** Comparação entre a distância COI intra e interespecífica utilizando as quatro espécies de *Salminus* atualmente válidas. Os quatro quadrantes indicados representam: (I) concordância entre a taxonomia atual e identificação molecular; (II) possível existência de espécies crípticas; (III) recente divergência, sinonímia ou hibridização; e, (VI) nenhuma correspondência entre taxonomia e identificação molecular. **85**
- Figura 4** Topologia de IB do marcador RAG2 com 24 sequências (926 pb). Símbolos representam as quatro espécies nominais: *S. affinis* (círculo), *S. brasiliensis* (quadrado), *S. franciscanus* (estrela) e *S. hilarii* (triângulo). Número acima dos ramos representam probabilidades posteriores. Apenas probabilidades acima de 90% são representadas. **86**

## Capítulo 2

- Figura 1** Reconstrução dos cenários evolutivos para testar as hipóteses Paleogeográfica e Hidrogeológica. (1) Hipótese Paleogeográfica apresenta uma assinatura de vicariância. Neste cenário, nós assumimos uma população ancestral, com tamanho efetivo  $N_a$ , que no tempo  $t_3$  sofre uma divisão e duas novas populações são formadas com tamanho efetivo menor que o  $N_a$  ( $N_1$  e  $N_2$ ). (2) Hipótese Hidrogeológica tem uma assinatura de geodispersão. Nós assumimos um pequeno número de fundadores ( $N_{1f}$  ou  $N_{2f}$ , onde “f” significa fundador), originado a partir de uma bacia-fonte, que coloniza uma bacia adjacente após o evento de captura em  $t_3$ , seguida por uma expansão populacional em  $t_1$ . **137**
- Figura 2** Locais de coleta de *Salminus*. *Salminus affinis* (◆), *Salminus brasiliensis* (■), *Salminus franciscanus* (★), *Salminus hilarii* (▲), *Salminus* sp. Amazonas (●) e *Salminus* sp. Araguaia (✦). **138**
- Figura 3** Cenários evolutivos testados através da análise ABC no DIYABC. Em (a) *S. brasiliensis*, (b) *S.* sp. Araguaia e *S.* sp. Amazonas e (c) *S. hilarii*. Cores representam as bacias hidrográficas onde as amostras foram coletadas (Fig. 2). **139**
- Figura 4** Análise filogenética bayesiana e estimativa de tempo de divergência no BEAST v1.8.1 empregando dois marcadores mitocondriais (COI e CytB) e dois nucleares (RAG2 e S7). Nós usamos um evento biogeográfico para a calibração da topologia (círculo vermelho). Números abaixo dos nós representam as estimativas de tempo de divergência, enquanto os números acima representam a probabilidade posterior. Barras azuis representam 95% HPD dos tempos estimados. **140**
- Figura S1** Primeira rodada dos cenários evolutivos testados para *S. hilarii* usando o DIYABC. (a) cenário de vicariância, (b) cenário de **141**

geodispersão com o Alto rio Paraná como bacia-fonte, e (c) cenário de geodispersão com o rio São Francisco como bacia-fonte.

**Figura S2** Filogenias gênicas recuperadas através da análise bayesiana, realizadas no BEAST, para o gênero *Salminus*. (a) COI; (b) Cytb; (c) RAG2 e (d) íntron S7. A barra de escala representa a estimativa de substituição por sítio. Números acima dos nós indicam as probabilidades posteriores aceitáveis (>0.90). O grupo externo foi retirado da ilustração. **142**

**Figura S3** Estimativa de áreas ancestrais para as espécies de *Salminus* de acordo com o modelo biogeográfico mais provável (DIVALIKEj) calculado a partir do BioGeoBEARS. As setas indicam prováveis eventos de geodispersão, hipotetizados a partir da correlação com dados geológicos conhecidos. **143**

## Apêndice

**Apêndice 1** Fotografia das MOTUs de *Salminus* estimadas na análise *multiloci*. **161**  
(A) *Salminus affinis* (indivíduo não analisado). (B) *Salminus brasiliensis* (indivíduo SB\_580). (C) *Salminus franciscanus* (indivíduo SF\_035). (D) *Salminus hilarii* (indivíduo SH\_160). (E) *Salminus* sp. Amazonas (indivíduo SI\_026). (F) *Salminus* sp. Araguaia (indivíduo não analisado). A barra de escala representa 5 cm. Fotos por (A) W. R. C. Flor, (B) – (E) C. Machado. (F) P. Venere.

## LISTA DE TABELAS

		Página
<b>Capítulo 1</b>		
<b>Tabela 1</b>	Área de distribuição e locais de coleta de <i>Salminus</i> na América do Sul.	<b>78</b>
<b>Tabela 2</b>	Média das distâncias genéticas, através do modelo de K2P, entre as oito MOTUs de <i>Salminus</i> . Em negrito, na diagonal, são os valores médios das distâncias intra-MOTU.	<b>82</b>
<b>Tabela S1</b>	Informação sobre os números de acesso das sequências COI e RAG2.	<b>87</b>
<b>Tabela S2</b>	Média e máxima distância intraespecífica das espécies de <i>Salminus</i> , baseadas em K2P.	<b>89</b>
<b>Tabela S3</b>	Modelos de evolução nucleotídica para cada partição por posição do códon determinados com Partition Finder 1.1.1, usando critério de informação bayesiana.	<b>89</b>
<b>Capítulo 2</b>		
<b>Tabela 1</b>	Probabilidades posteriores de cada cenário estimada usando DIYABC. A maior probabilidade está em negrito.	<b>135</b>
<b>Tabela 2</b>	Valores posteriores dos parâmetros para os cenários com alta probabilidade (Vencedores). A unidade de tempo, contada em geração, foi convertida em 10 <sup>6</sup> anos antes do presente (Ma), baseada na média do tempo de geração de 2 anos (De Godoy 1975).	<b>136</b>
<b>Tabela S1</b>	Locais de coleta de <i>Salminus</i> na América do Sul e número de acesso do Genbank.	<b>144</b>

<b>Tabela S2</b>	Sequências dos <i>primers</i> empregados neste estudo e a temperatura de anelamento utilizada na PCR.	<b>148</b>
<b>Tabela S3</b>	Probabilidade posterior bayesiana estimada usando DIYABC para cada cenário (Rodada 1 – <i>Salminus hilarii</i> ).	<b>149</b>
<b>Tabela S4</b>	Distribuição <i>a priori</i> dos parâmetros para cada cenário (Fig. 3).	<b>150</b>
<b>Tabela S5</b>	Taxas de erro tipo I e tipo II estimadas para cada cenário vencedor de cada espécie usando DIYABC.	<b>152</b>

## LISTA DE ABERVIATURAS E SIGLAS

<b>ABC</b>	Computação bayesiana aproximada ( <i>Approximate Bayesian Computation</i> )
<b>BOLD</b>	<i>Barcode of Life Database</i>
<b>CBOL</b>	<i>Consortium for the Barcode of Life</i>
<b>COI</b>	Citocromo C Oxidase I
<b>CRSB</b>	<i>Rift Continental do Sudeste do Brasil (Continental Rift of Southeastern Brazil)</i>
<b>Cytb</b>	Citocromo B
<b>DCARSF</b>	Descontinuidade Crustal do Alto Rio São Francisco
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNAmit</b>	DNA mitocondrial
<b>ESS</b>	Tamanho efetivo da amostragem ( <i>Effective Sample Size</i> )
<b>GMYC</b>	<i>Generalized mixed Yule-coalescent</i>
<b>HPD</b>	Maior densidade de probabilidade ( <i>highest probability density</i> )
<b>IB</b>	Inferência Bayesiana
<b>ICMBio</b>	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
<i>indels</i>	Inserções e deleções
<b>K2P</b>	Kimura 2-parâmetros
<b>Ma</b>	<i>Megaanum</i>
<b>matK</b>	Maturase K
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MOTU</b>	Unidades taxonômicas operacionais moleculares ( <i>Molecular Operational Taxonomic Units</i> )
<b>MRCA</b>	Ancestral comum mais recente ( <i>Most Recent Common Ancestor</i> )
<b>NJ</b>	<i>Neighbor-Joining</i>
<b>NUMT</b>	Pseudogenes mitocondriais nucleares ( <i>Nuclear mitochondrial DNA segment</i> )
<b>OT</b>	Ótimo <i>Threshold</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RAG2</b>	<i>Recombination Activating Gene 2</i>
<b>rbcL</b>	Ribulose bifosfato carboxilase ( <i>ribulose-1,5,bisphosphate carboxylase</i> )
<b>SISBIO</b>	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
<b>UES</b>	Unidades Evolutivas Significativas

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>22</b>
2.1 Evolução geológica do continente sul-americano e o impacto na formação das bacias hidrológicas .....	22
2.2 Biogeografia histórica e Filogeografia: um contexto para peixes Neotropicais .....	27
2.3 Gênero <i>Salminus</i> : modelo para estudos filogeográficos .....	31
2.4 DNA <i>barcoding</i> : ferramenta para identificação molecular .....	35
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>
<b>4. PERGUNTAS E HIPÓTESES .....</b>	<b>48</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
5.1 Objetivo geral .....	49
5.2 Objetivos específicos .....	49
<b>CAPÍTULO 1: DNA <i>barcoding</i> revela incertezas taxonômicas em <i>Salminus</i> (Characiformes) .....</b>	<b>50</b>
Resumo .....	52
Introdução .....	53
Material e Métodos .....	55
Material amostrado .....	55
Extração de DNA, amplificação, purificação e sequenciamento .....	56
Análise de dados .....	57
Resultados .....	60
Discussão .....	64
Diversidade críptica em <i>S. brasiliensis</i> .....	65
Diversidade críptica em <i>S. hilarii</i> .....	66
Conclusões e Aplicação .....	68
Agradecimentos .....	69
Referências Bibliográficas .....	71
Tabelas e Figuras .....	78
Material suplementar .....	87

<b>CAPÍTULO 2: Testando cenários biogeográficos: Abordagem bayesiana revela história evolutiva de peixes Neotropicais .....</b>	<b>90</b>
Resumo .....	92
Introdução .....	94
Material e Métodos .....	97
Amostragem de dados moleculares .....	97
Inferência filogenética .....	98
Estimativas de tempos de divergência .....	99
Testando cenários biogeográficos com <i>Approximate Bayesian Computation</i> .....	101
Definindo cenários .....	102
Distribuição dos <i>priors</i> dos parâmetros e estatísticas sumárias .....	103
Comparação de cenários .....	104
Estimativa e precisão dos parâmetros e checagem do modelo .....	104
Resultados .....	105
Relações filogenéticas entre as espécies de <i>Salminus</i> .....	105
Tempos de divergência entre as espécies de <i>Salminus</i> .....	106
Testando hipóteses biogeográficas com análise ABC para <i>S. brasiliensis</i> , <i>S. hilarii</i> , e <i>S. sp. Amazonas</i> e <i>S. sp. Araguaia</i> .....	107
Discussão .....	109
Filogenia de <i>Salminus</i> .....	109
História evolutiva de <i>Salminus</i> .....	112
<i>Approximate Bayesian Computation</i> e teste de hipóteses biogeográficas .....	118
Agradecimentos .....	121
Referências Bibliográficas .....	122
<i>Biosketch</i> .....	134
Tabelas e Figuras .....	135
Material suplementar .....	141
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>153</b>
Referências Bibliográficas .....	158
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>160</b>

<b>8. APÊNDICE .....</b>	<b>161</b>
Apêndice 1 .....	<b>161</b>

## 1. Apresentação

Popularmente conhecidos como dourados e tabaranas, *Salminus* é constituído por peixes predadores de médio e grande porte, que realizam migrações reprodutivas e apresentam grande importância na pesca comercial e esportiva. Atualmente, está constituído por quatro espécies válidas distribuídas nas bacias hidrográficas sul-americanas, principalmente brasileiras. Contudo, o status taxonômico de algumas espécies é questionável, principalmente devido às variações morfológicas intraespecíficas. A monofilia do gênero é evidente e bem suportada por dados moleculares e morfológicos. Entretanto as relações intragenéricas são difíceis de compreender.

Apesar da importância comercial e ecológica apresentada pelas espécies de *Salminus*, o conhecimento taxonômico, filogenético e filogeográfico ainda são escassos. As informações geradas através do presente estudo não responderão apenas perguntas relacionadas à validade taxonômica das espécies, às relações evolutivas entre elas e aos prováveis eventos biogeográficos que geraram a especiação desses organismos, mas principalmente auxiliarão programas de conservação em áreas ameaçadas. Isso porque peixes migradores são considerados espécies guarda-chuva, ou seja, organismos que requerem uma área extensa de habitat, sendo importantes candidatos no planejamento e monitoramento da conservação da biodiversidade, sob a perspectiva de que preservar populações viáveis destas espécies é preservar inúmeras outras espécies com necessidades de área menor.

Para melhor apresentar o conteúdo do nosso estudo, a tese foi dividida em uma fundamentação teórica, contendo informações que nos ajudarão a compreender algumas lacunas do conhecimento sobre o gênero *Salminus*, seguida de dois capítulos, em formato de artigos científicos, redigidos de acordo com as exigências dos periódicos de interesse. O capítulo 1, intitulado “DNA *barcoding* revela incertezas taxonômicas em *Salminus* (Characiformes)”, demonstra a eficácia da metodologia do DNA *barcoding* em identificar que os polimorfismos intraespecíficos observados previamente em estudos morfológicos são resultados de problemas taxonômicos que necessitam ser avaliados. Nesse capítulo, o objetivo foi sinalizar quais espécies apresentavam esses problemas e como essas informações podem auxiliar no status de conservação do gênero. O artigo encontra-se aceito na revista *Systematics and Biodiversity*. Uma informação importante, é que esse artigo será tratado no capítulo 2 como “Machado et al. (no prelo)”.

O capítulo 2, intitulado “Testando cenários biogeográficos: Abordagem bayesiana revela história evolutiva de peixes Neotropicais”, aborda outras importantes lacunas do

gênero: filogenia e filogeografia. Apesar de uma filogenia molecular ter sido publicada (Abe et al., 2014), ela apresenta incongruências com os nossos dados, o que nos permitirá avaliar e discutir sobre essas diferenças. O mesmo ocorre para a filogeografia, onde os autores sugerem processos de divergência das espécies diferentes do que estamos propondo. Um aspecto importante e diferencial desse capítulo será a utilização da abordagem bayesiana para testar hipóteses filogeográficas alternativas. Pela primeira vez, um estudo desse tipo é realizado em representantes da ictiofauna neotropical.

Posterior a apresentação desses capítulos, faremos nossas considerações finais, descrevendo as implicações para a conservação do gênero e para história evolutiva da ictiofauna neotropical. Todas as seções dessa tese contêm suas próprias referências bibliográficas. E, finalmente, haverá uma seção de conclusões onde as principais contribuições para ultrapassar a fronteira do conhecimento sobre o gênero *Salminus* serão apresentadas em tópicos.

## 2. Fundamentação teórica

### 2.1 Evolução geológica do continente sul-americano e o impacto na formação das bacias hidrológicas

Compreender a evolução dos sistemas de drenagem modernos é fundamental para discutir sobre os prováveis processos de diversificação da ictiofauna. O dinamismo dos sistemas hidrográficos, com rupturas e coalescência das bacias, é o principal promotor dos eventos de especiação dos organismos de água doce (ALBERT; REIS, 2011). Por essa razão, a história de algumas das principais bacias sul-americanas será brevemente discutida e relacionada a eventos tectônicos e climáticos do continente que influenciaram o desenvolvimento de suas modernas configurações.

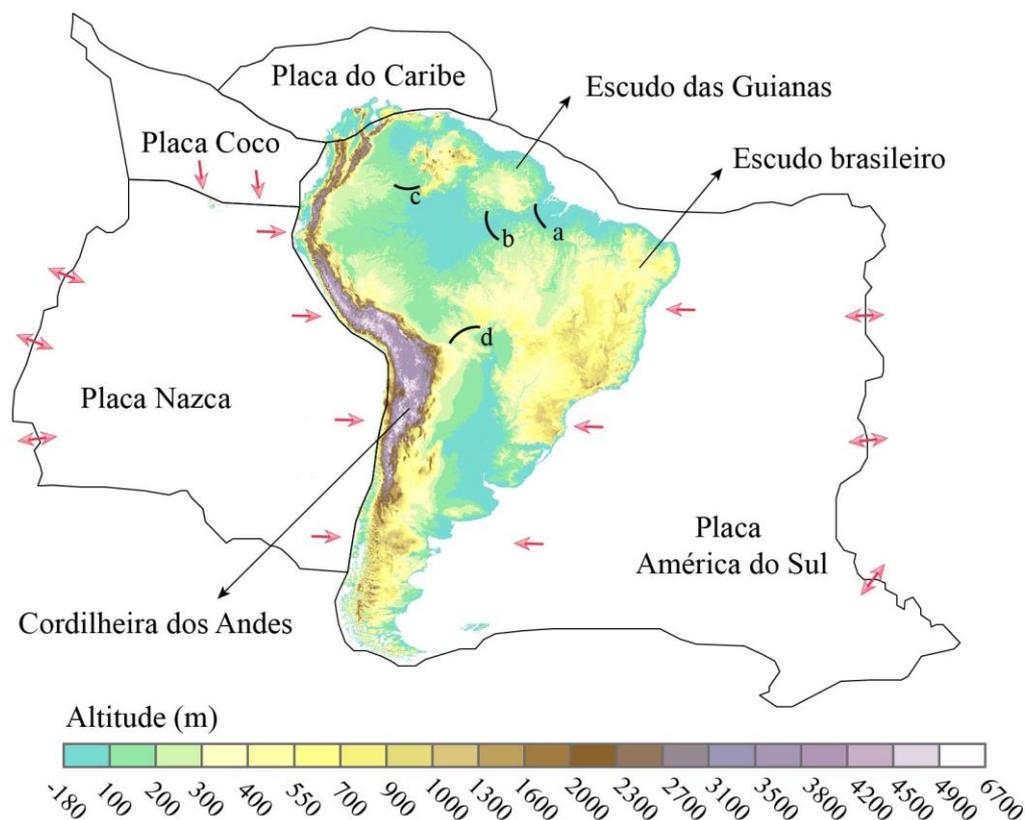
A principal estrutura geológica da região Neotropical é a Plataforma sul-americana, porção estável que ocupa 62% da placa continental moderna e que não é afetada pelas zonas orogênicas (regiões onde ocorrem os processos de formação das cadeias montanhosas) (ALBERT; REIS, 2011). É nessa porção onde encontramos estruturas geológicas importantes que moldaram o padrão das drenagens, como os Escudos Cristalinos (Brasileiro e das Guianas). Ainda na porção continental da Placa América do Sul é possível observar a Cordilheira dos Andes, a bacia Antepaís (região de acúmulo de sedimentos, pouco deformada pelo processo tectônico e que está adjacente aos Andes), além de vários arcos estruturais (Figura 1) (LUNDBERG et al., 1998).

Dois eventos geológicos foram chaves na reorganização da paisagem hidrogeológica: (1) A quebra da Gondwana (tratado, nessa etapa geológica, como o supercontinente formado por África e América do Sul), que se iniciou há 130 Ma (*Megaanum*, unidade de tempo equivalente a um milhão de anos)<sup>1</sup> e culminou há 90 Ma. Esse processo resultou no isolamento entre África e América do Sul e na abertura do oceano Atlântico. (2) E, a formação da cordilheira dos Andes, resultada da compressão tectônica das placas Nazca e América do Sul. O processo se iniciou há 90 Ma e ao longo de sua história apresentou múltiplas fases de elevação tectônica que atuaram ativamente no remodelamento da paisagem (LUNDBERG et al., 1998).

---

<sup>1</sup> A escala do tempo geológico abordada nesse trabalho está de acordo com Comissão Internacional sobre Estratigrafia (COHEN et al., 2013).

Figura 1 – Características geológicas e topográficas da Placa sul-americana. As letras representam alguns dos principais arcos estruturais da América do Sul: (a) Arco de Gurupa, (b) Arco de Purus, (c) Arco de Vaupes e (d) Arco de Michicola. As setas vermelhas indicam o sentido de deslocamento das placas tectônicas (Modificado de LUNDBERG et al., 1998).



Pouco se sabe sobre os padrões das paleobacias<sup>2</sup> no período anterior à quebra da Gondwana. É provável que muitas bacias conhecidas atualmente não existissem devido ao clima árido e semiárido no interior do continente (POTTER, 1997). Algumas paleodrenagens do sul do continente, originadas nos escudos cristalinos, apresentavam direção diferente da atual, percorrendo rumo ao oceano Pacífico. Porém, com a completa abertura do oceano Atlântico (aproximadamente há 90 Ma), a região central do Andes iniciou seu processo de soerguimento. Essa elevação na porção oeste do continente afetou a direção das paleodrenagens, redirecionando-as para o Atlântico (SMITH; SMITH; FUNNELL, 1994). Uma paleodrenagem que não mudou seu curso, em decorrência desse evento, foi o paleo-Amazonas, que continuou com seu sentido para oeste. Isso aconteceu porque a atual vazão para o Atlântico estava interrompida pelo *Rift* do Marajó durante o Cretáceo. Com a elevação

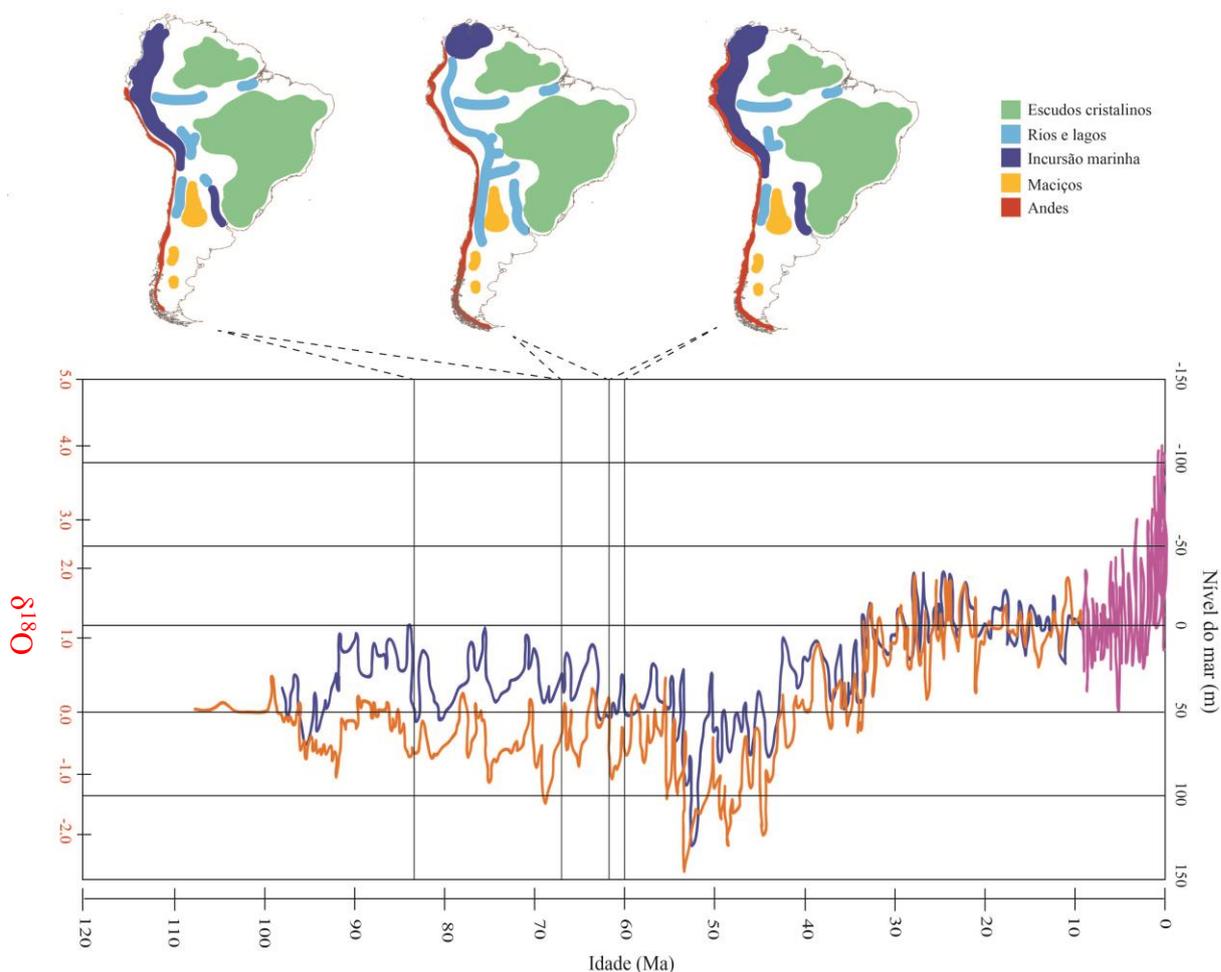
<sup>2</sup> Termo que será empregado para designar uma configuração antiga das atuais bacias hidrográficas.

progressiva dos Andes no Paleoceno, o paleorio foi redirecionado para o leste, porém, o surgimento do arco de Purus, na porção mediana do curso atual do Amazonas, impediu a mudança de trajeto (LUNDBERG et al., 1998). Inclusive, o arco de Purus dividiu a bacia do paleo-Amazonas em duas porções: leste (que desaguava no oceano Atlântico) e oeste (que desaguava no Mar do Caribe). Esta divisão continuará até a erosão dessa estrutura durante o Mioceno Superior (~8 Ma) (COSTA et al., 2001; LUAN; ARMBRUSTER, 2011).

Concomitantemente aos processos de separação da Gondwana e início da formação dos Andes, as incursões marinhas também modelavam as paleodrenagens. Durante o Cretáceo Superior (83-67 Ma) e metade do Paleoceno (61-60 Ma) o nível do mar aumentou aproximadamente 100 metros (m), inundando as terras baixas e assim reduzindo as áreas das paleobacias (Figura 2). É durante o intervalo entre essas duas incursões que ocorre o estabelecimento dos sistemas de drenagem que foram considerados os ancestrais da porção oeste do Amazonas-Orinoco-Magdalena e do Paraná-Paraguai. A primeira paleobacia tem seu curso para o norte (as primeiras elevações dos Andes fecham a sua passagem para o Oceano Pacífico, sendo desviada para o Mar do Caribe), enquanto a segunda tem direção oposta, desaguando no sul do Atlântico (LUNDBERG et al., 1998). Até a formação do Arco de Michicola (~10 Ma - LUNDBERG et al., 1998), não haverá uma barreira impermeável entre essas paleobacias adjacentes. Por essa razão, ambas experimentarão sucessivos eventos de capturas de cabeceira, que permitirão trocas de fauna aquática importantes para o processo de diversificação de vários grupos de peixes (TAGLIACOLLO et al., 2015).

Com o progressivo soergimento da porção Central dos Andes, durante a metade do Eoceno (43 Ma), a bacia Antepaís passa a ser ocupada pelo lago Pozo (43-30 Ma), predecessor ao famoso lago Pebas. Outro importante evento dessa época é a perda de uma barreira semipermeável (Serras Pampeanas) entre as paleodrenagens Amazonas e Paraná-Paraguai, resultando em uma grande captura da cabeceira do paleo-Amazonas por parte do paleo-Paraná-Paraguai. Entre o Oligoceno Superior e na metade do Mioceno (30-20 Ma), outra barreira temporária surge entre essas paleobacias. A formação de Chapare *Buttress*, originada a partir do contato dos Andes com a porção oeste do escudo brasileiro, permanece até ~10 Ma, quando ambas as bacias se separam permanentemente (LUNDBERG et al., 1998).

Figura 2 – Estimativas no nível do mar derivadas a partir de Nova Jérsei (EUA) que providenciam um registro global para os últimos 100 Ma e como interferiram na paisagem hidrológica sul-americana entre 83 – 60 Ma. As diferentes cores representam as fontes bibliográficas de onde os dados foram retirados: laranja – Kominz et al., (2008); azul – Miller et al. (2005) e roxo – Lisiecki e Raymo (2004). Modificado a partir de Miller et al. (2011).



Durante os períodos de rápida compressão da placa Nazca (90-75 Ma, 50-40 Ma e 25-0 Ma), as falhas geológicas da costa leste do continente sul-americano, que forma um conjunto denominado de *Rift* Continental do Sudeste do Brasil (CRSB), eram reativadas (COBBOLD et al., 2001). Originado no Jurássico Superior (163-145 Ma), o CRSB evoluiu sucessivamente para a ruptura continental e abertura do Oceano Atlântico (RICCOMINI et al., 2004). As reativações geológicas do CRSB foram eventos tectônicos significativos na modelagem das bacias costeiras, uma vez que promoveram inúmeras capturas de cabeceira entre essas bacias e as bacias do escudo brasileiro (RIBEIRO, 2006). Um exemplo interessante, resultante dessas ativações, é o da paleobacia do rio Tietê, que desaguava no oceano Atlântico, juntamente com a paleobacia do Alto Paraíba do Sul, e teve seu curso

alterado, após uma reativação tectônica, para o interior do continente, passando a fazer parte da bacia do Alto rio Paraná (AB'SABER, 1957).

A paisagem do noroeste do continente, a partir do Mioceno inferior (20 Ma), começa a mudar com o início do soerguimento da porção norte dos Andes e com as novas incursões marinhas. A principal característica desse período é uma bacia Antepaís com extensos lagos de águas doce (Sistema Pebas), alimentados por paleorios provenientes dos Andes e escudos cristalinos, que se conectam a áreas sob influência marinha (mar Pebasian) (LUNDBERG et al., 1998). Do ponto de vista ictiológico, essa porção do continente foi muito diferente do que é hoje, devido ao dinamismo de ecossistemas (dulcícola e marinho). Em ciclos de incursões marinhas mais extensivas, a água do mar invadia o sistema Pebas, promovendo extinções e eventos de vicariância entre as espécies de água doce. Vários grupos, como as arraias e alguns cianídeos, tornaram-se adaptados ao ambiente de água doce e rapidamente se irradiaram (LOVEJOY; BERMINGHAM; MARTIN, 1998; LOVEJOY; DE ARAÚJO, 2000).

Os processos de elevação da cordilheira oriental dos Andes na metade do Mioceno (~12 Ma) e dos Andes de Méridas no Mioceno superior (~8 Ma) culminaram na delimitação das fronteiras das drenagens modernas na porção Noroeste da América do Sul, incluindo Oeste do Amazonas, Orinoco, Maracaibo e Magdalena (ALBERT; LOVEJOY; CRAMPTON, 2006). A cadeia oriental dos Andes isolou o paleo-Magdalena do paleo-Amazonas-Orinoco, tornando-se o evento promotor da diversificação da ictiofauna cis e transandina. Os Andes de Méridas limitou o paleo-Maracaibo do paleo-Orinoco. E, a formação do Arco de Vaupes (~10.5 Ma), tornou-se a barreira entre a bacia do paleo-Amazonas e do paleo-Orinoco. Essa última estrutura bloqueou o fluxo do Lago Pebas para o Mar do Caribe. Sem ter para onde escoar, as águas acumuladas rompem o arco de Purus, resultando no estabelecimento do atual curso do Amazonas (LUNDBERG et al., 1998).

Os estágios finais para os modernos padrões hidrológicos são caracterizados pelas oscilações climáticas (Plio-Pleistoceno, 5-0.1 Ma), que resultaram em novos ciclos de incursão e regressão marinha, e sucessivas reativações neotectônicas. Os ciclos marinhos afetaram principalmente a foz do Amazonas (LUNDBERG et al., 1998) e as bacias costeiras do Leste (RIBEIRO, 2006). Já as reativações promoveram a separação do Tocantins-Araguaia e Amazonas (2.5 – 1.8 Ma) (ROSSETTI; VALERIANO, 2007) e o surgimento do Pantanal (2.5 Ma) (RIBEIRO et al., 2013). A formação do Istmo do Panamá (~3 Ma), que apesar de não influenciar a disposição das drenagens do continente, também foi um importante evento de enriquecimento de ictiofauna da região noroeste (BERMINGHAM; MARTIN, 1998).

Entre as grandes bacias brasileiras, o Alto rio Paraná, Paraguai, Uruguai, São Francisco e muitos rios costeiros, como o Doce e Jequitinhonha, adquiriram seu curso atual como resultado do tectonismo associado com a quebra da Gondwana (POTTER, 1997; RIBEIRO, 2006). Para essas bacias, as reativações neotectônicas tiveram e ainda têm um importante papel no rearranjo de suas configurações resultando em vários eventos de capturas de cabeceiras entre as bacias adjacentes. Essas reativações foram também responsáveis pela formação de algumas corredeiras e cachoeiras que funcionam como barreira vicariante entre áreas de um mesmo rio como as Corredeiras do Teotônio (rio Madeira), Cataratas do Iguçu e a extinta Catarata de Sete quedas (LOVEJOY et al., 2010).

Em suma, a formação do divisor andino e de outras estruturas geológicas, mudanças de curso de rios e repetidas incursões e regressões marinhas produziram inúmeros eventos de divergência alopátrica e geodispersão<sup>3</sup> no últimos 90 Ma. Portanto, as principais hipóteses de diversificação da ictiofauna abordarão esses elementos como explicação da origem e manutenção da biodiversidade Neotropical.

## 2.2 Biogeografia histórica e Filogeografia: um contexto para peixes Neotropicais

A biogeografia é um campo da ciência que analisa a distribuição geográfica dos organismos ao longo do tempo (LOMOLINO; SAX; BROWN, 2004). A disciplina tem raízes científicas profundas, com alguns grandes temas já estabelecidos desde o início dos anos de 1800 (WHITTAKER et al., 2005). Apresenta uma abordagem descritiva, que objetiva apenas reconhecer os padrões de distribuição, e uma interpretativa, quando busca explicações para tais padrões que podem ser resultados de fatores ecológicos (Biogeografia ecológica) ou históricos (Biogeografia histórica) (POSADAS; CRISCI; KATINAS, 2006). A principal diferença entre a Biogeografia ecológica e histórica está no contexto espaço-temporal. Enquanto os processos ecológicos ocorrem em uma curta escala espaço-temporal, os processos históricos ocorrem em espaço global durante milhões de anos (CRISCI; KATINAS; POSADAS, 2003).

A abordagem histórica considera dispersão, vicariância e extinção como processos que afetam igualmente a distribuição dos organismos (POSADAS; CRISCI; KATINAS, 2006). A existência sobre os processos de extinções tem sido aceita amplamente pela comunidade

---

<sup>3</sup> Termo cunhado por Lieberman (2000) e significa a expansão da área limite de um grupo de espécies devido a eliminação temporária de uma barreira.

científica, o que não é o caso dos outros dois. A vicariância é definida como um evento em que uma população ancestral é dividida em subpopulações devido ao desenvolvimento de uma barreira impermeável (o fluxo gênico é interrompido). Essa barreira pode ser topográfica, aquática, oceânica, tectônica, ambiental, climática ou biótica (WILEY, 1988). Já a dispersão pode ser diferenciada em duas: a dispersão biológica, parte da população ancestral ultrapassa uma barreira pré-existente, colonizando uma nova área, e a geodispersão. O padrão biogeográfico da geodispersão e da vicariância envolve múltiplas taxa. Por outro lado, a dispersão biológica envolve apenas um ou poucos grupos de espécies (HO et al., 2015). Consideradas hipóteses conflitantes, vicariância e geodispersão são os processos alopátricos mais discutidos dentro da evolução da ictiofauna sul-americana (CRISCI; KATINAS; POSADAS, 2003; MONTOYA-BURGOS, 2003).

Com o advento de dados moleculares e métodos de bioinformática para analisar as diferenças genéticas em nível populacional, novos conhecimentos sobre a ictiofauna dulcícola neotropical foram adicionados. A abordagem genética permitiu o surgimento da filogeografia como uma subdisciplina da biogeografia (AVISE, 2000), tornando-se uma ferramenta poderosa especialmente em casos de incertezas taxonômicas, proporcionadas pela existência de espécies crípticas, plasticidade fenotípica e falta de clareza na taxonomia morfológica, além de calibrações temporais das filogenias, ajudando a compreender a cronologia dos eventos de divergência das linhagens (ou níveis superiores). A filogeografia examina os processos que afetaram a estrutura genética das linhagens genealógicas, especialmente dentro e entre espécies estreitamente relacionadas, incluindo os efeitos da dinâmica da paisagem, eventos de dispersão ou geodispersão e prováveis extinções locais (AVISE, 2000).

A ictiofauna dulcícola da região Neotropical é a mais rica do mundo com mais de 5000 espécies descritas (REIS et al., 2016). As razões para os prováveis mecanismos que promoveram e mantiveram esses altos níveis de diversidade são principalmente históricas e estão associadas, como visto anteriormente, ao desenvolvimento dos sistemas de drenagens modernos (LUNDERG et al., 1998).

Entre as primeiras hipóteses a serem sugeridas, destaca-se as flutuações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno, que fragmentava e reconectava habitats, promovendo especiação alopátrica. Essa hipótese é conhecida como Teoria do Refúgio e foi proposta por Haffer (1982). No entanto, apesar de outros trabalhos suportarem essa teoria (RENNO et al., 1990; HUBERT et al., 2007a), registros fósseis assinalaram que a diversificação de vários grupos de peixes modernos pré-datava o Pleistoceno (LUNDBERG, 1997), ou seja, a teoria do refúgio era uma explicação pontual para alguns grupos (WEITZMAN; WEITZMAN,

1982). Rull (2008), a partir de uma meta-análise, em que utilizou mais de 300 referências para avaliar quando e quais fatores levaram a diversificação espécies Neotropicais, também suporta essa ideia. Segundo o autor, 80% das unidades evolutivas significativas (UES) de peixes neotropicais que foram avaliadas surgiram antes do Pleistoceno.

As evidências moleculares indicam que importantes eventos de diversificação ocorreram entre 12 e 3 milhões de anos (ABE et al., 2014; ALBERT; LOVEJOY; CRAMPTON, 2006; BERMINGHAM; MARTIN, 1998; HUBERT et al., 2007b; LOVEJOY; DE ARAÚJO, 2000; MONTOYA-BURGOS, 2003; ROXO et al., 2014; SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTI, 2001; TAGLIACOLLO et al., 2015). Atualmente, existem três principais hipóteses, baseadas em processos paleoecológicos, que aconteceram durante esse período e que resultaram em eventos de especiação alopatrica: (i) hipótese Paleogeográfica (surgimento de uma barreira a partir de rearranjo tectônico, por exemplo, os paleoarcos, antigas cadeias de montanha, resultadas da dinâmica da formação dos Andes), (ii) hipótese Hidrogeológica (eventos de captura de cabeceiras gerando rotas temporárias de geodispersão) e (iii) a hipótese do Museu (incursões marinhas do Mioceno, gerando refúgios nos piemontes de regiões montanhosas). A especiação simpátrica teoricamente é possível, porém estudos empíricos são escassos, existindo poucos eventos convincentes. Para a região Neotropical apenas dois exemplos são reconhecidos: a heterogeneidade de habitat encontrada na sub-bacia do rio Madeira (bacia do rio Amazonas) acarretou na diversificação de três espécies do gênero *Serrasalmus* (HUBERT et al., 2007b); e, ciclídeos do gênero *Amphilophus*, presentes no Lago Nicarágua, que diversificaram por mecanismo ecológicos, como preferência de habitats na coluna d'água e utilização diferenciada de recursos (BARLUENGA et al., 2006).

As predições filogenéticas para a hipótese Paleogeográfica é que linhagens/espécies de bacias separadas por uma barreira geológica formam clados-irmãos, representando um evento clássico de especiação por vicariância (HUBERT; RENNO, 2006). Esse padrão é constantemente encontrado no noroeste da América do Sul, região que sofreu bastante com a dinâmica da formação dos Andes (ALBERT; LOVEJOY; CRAMPTON, 2006; MONTOYA-BURGOS, 2003). O evento de vicariância mais discutido nessa hipótese é entre a ictiofauna cis e transandina originada após o soerguimento da cadeia oriental dos Andes (ALBERT; LOVEJOY; CRAMPTON, 2006; SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTI, 2001). Processos secundários, como a formação dos paleoarcos também contribuiriam com a diversificação por vicariância na Amazônia. Hubert e Renno (2006), através de uma compilação de dados de distribuição de diversos táxons da ordem Characiformes, sugeriram que o Arco de Vaupes e de Michicola foram os responsáveis pela divisão ictiofaunística do Orinoco-Amazonas e

Amazonas-Paraná, respectivamente. Hubert et al. (2007b), também suportam a grande importância da formação dos palearcos na diversificação dos gêneros *Pygocentrus* e *Serrasalmus*.

No caso da hipótese Hidrogeológica, eventos de geodispersão, promovidos por captura de cabeceira, são os responsáveis pela diversificação da ictiofauna. É um caso especial de evolução da paisagem com formação e remoção de barreiras entre drenagens adjacentes. A assinatura biogeográfica desse evento é o não-monofiletismo entre linhagens/espécies de bacias adjacentes (MONTROYA-BURGOS, 2003; TAGLIACOLLO et al., 2015). Capturas de cabeceira são comumente observadas em áreas geológicas estáveis (escudos cristalinos), que estão cobertas de fraturas e falhas geológicas. As contínuas reativações tectônicas dessas áreas (datadas desde o Paleogeno, 66 Ma) promoveram rearranjos entre as bacias, resultando em eventos de captura de cabeceira e geodispersão da ictiofauna (RIBEIRO, 2006; ROXO et al., 2014). Montoya-Burgo (2003), estudando os processos de diversificação do gênero *Hypostomus* observou eventos hidrogeológicos entre Amazonas e os rios costeiros do Nordeste, promovidos pelo o recuo do mar seguido de coalescência das drenagens (6-5Ma); no Escudo brasileiro eventos de captura entre o Alto rio Paraná e o rio São Francisco também ocorreram no mesmo período; e, entre o Alto rio Paraná e os rios costeiros (BUCKUP, 2011). Este último evento é bem discutido por Ribeiro (2006). Hubert e Renno (2007b) evidenciaram uma extensa área de ramificação envolvendo o Alto Madeira (Guaporé, Mamoré, Madre de Dios), Tocantins-Araguaia, Paraguai e Tapajós que providencia uma oportunidade para a geodispersão da ictiofauna, através de sucessivos eventos de captura. Esses resultados também são consistentes com os achados de Sivasundar et al. (2001), Carvalho e Albert (2011) e Roxo et al. (2014).

Na hipótese do Museu, as espécies amplamente distribuídas apresentam linhagens basais presentes nos escudos cristalinos Brasileiro e das Guianas. Isso ocorre porque as incursões marinhas (aumentando o nível do mar em 100 metros) ocorridas no Mioceno (20-5 Ma) fragmentaram o habitat, e isolaram as populações nessas áreas altas, extinguindo as de terra baixa. Já as linhagens de terras baixa surgiram após as regressões marinhas (últimos 5 Ma) (HUBERT et al., 2007b). Segundo Hubert e Renno (2006), a assinatura biogeográfica seria de áreas elevadas com altos níveis de endemismo (chamadas de refúgio), enquanto as áreas baixas teriam alta diversidade de espécies, porém baixos níveis de endemismo. Essas predições foram confirmadas para os gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (HUBERT et al., 2007b), *Plagioscion* (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2011), para espécies da subfamília

Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Otothyrinae (ROXO et al., 2014) e para alguns eventos de diversificação da família Bryconidae (ABE et al., 2014).

Apesar desse incremento de informação em estudos biogeográficos a origem da ictiofauna sul-americana é ainda amplamente debatida. Devido à grande complexidade de padrões biogeográficos da região, não há concordância sobre a generalidade de algumas dessas explicações, nem se elas são mutuamente exclusivas (HUBERT; RENNO, 2006). Portanto, visando oferecer *insights* sobre a história biogeográfica da região Neotropical, utilizaremos como modelo biológico as espécies do gênero *Salminus*. Conforme será discutido no próximo tópico, a escolha desse grupo se baseia em características importantes para estudos filogeográficos dessa região como o monofiletismo, grande capacidade migratória e a ampla distribuição na América do Sul.

### 2.3 Gênero *Salminus*: organismo modelo para estudos filogeográficos

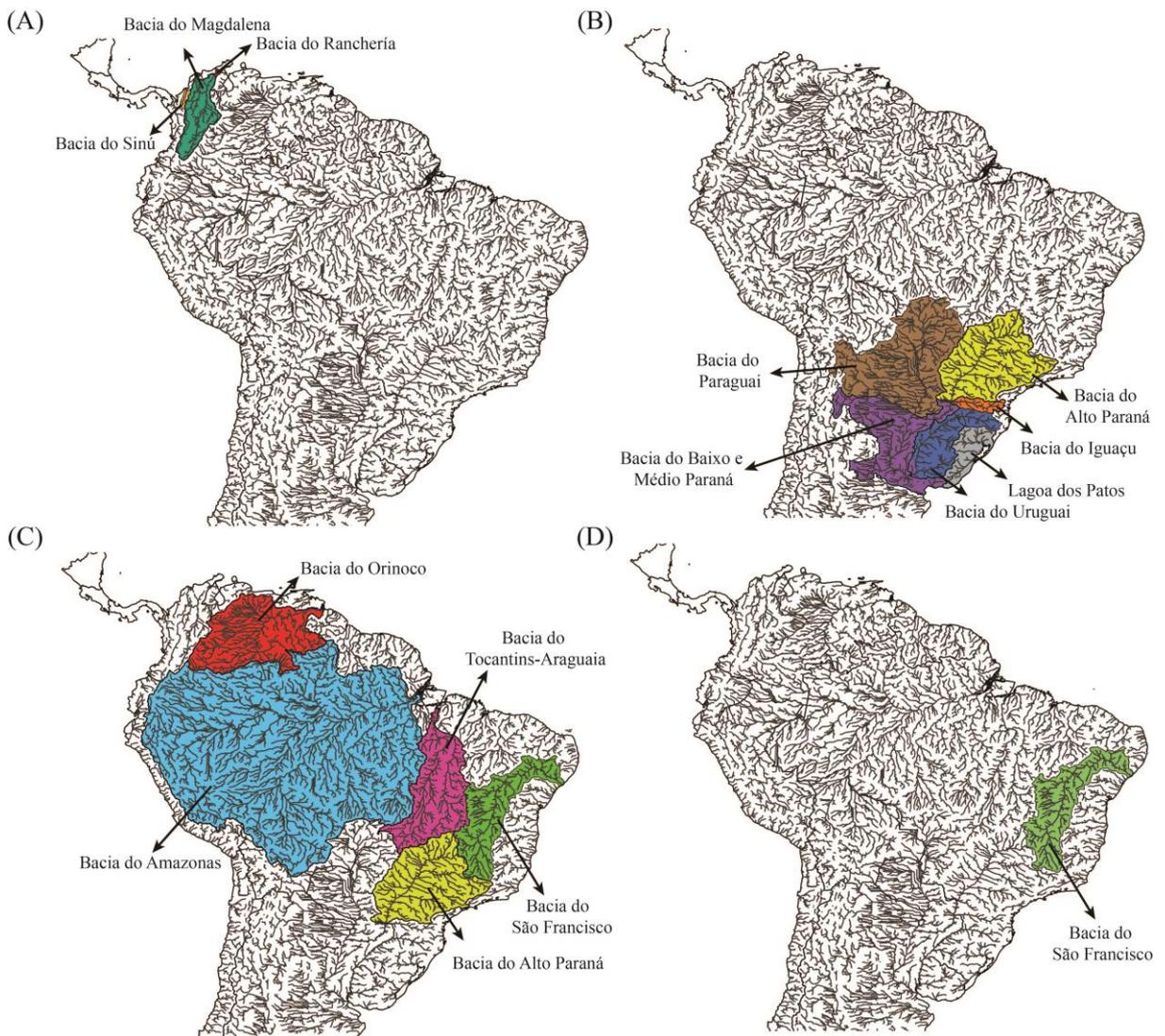
Popularmente conhecido no Brasil como tabarana e dourado, *Salminus* pertence a ordem Characiformes e está constituído por peixes de médio e grande porte, que realizam migrações reprodutivas durante o período das chuvas e possuem importância na pesca comercial, de subsistência e esportiva. Estão distribuídos amplamente nas principais bacias hidrográficas sul-americanas (Figura 3), onde são encontrados em ambientes lóticos (rios de primeira e segunda ordem). Nos estágios iniciais de desenvolvimento, as espécies do gênero em vida livre são planctívoras e quando adultos apresentam comportamento predatório desempenhando, assim, um papel fundamental na dinâmica, no funcionamento e estrutura dos ecossistemas aquáticos (ESTEVES; PINTO-LOBO, 2001; LIMA; BRITSKI, 2007; RODRÍGUEZ-OLARTE; TAPHORN., 2006).

A história taxonômica do grupo é bem complexa e contraditória (LIMA; BRITSKI, 2007). Atualmente, quatro espécies são consideradas válidas (LIMA et al., 2003; LIMA; BRITSKI, 2007 - ver imagens das espécies no Apêndice 1, A-D):

- *Salminus affinis* (Steindachner, 1880 – holótipo proveniente do rio Cauca): restrita às bacias transandinas do rio Magdalena, Ranchería e Sinú, Colômbia;
- *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816 – holótipo proveniente do rio Cuiabá): presente ao longo de toda bacia Platina (Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil); sistema do rio Iguazu, Jacuí, Lagoa dos Patos, todos no sul do Brasil;
- *Salminus franciscanus* (Lima e Britski, 2007 – holótipo proveniente do rio São Francisco): Espécie descrita recentemente. É endêmica da bacia do rio São Francisco;

- *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1850 – holótipo proveniente do rio São Francisco): encontrada nas bacias dos rios São Francisco, Alto Paraná, Tocantins-Araguaia, Alto Amazonas e Orinoco.

Figura 3 – Distribuição geográfica das espécies de *Salminus*. (A) *Salminus affinis*. (B) *Salminus brasiliensis*. (C) *Salminus hilarii*. (D) *Salminus franciscanus*. As cores representam as diferentes bacias hidrográficas sul-americanas.



Em dados não publicados, Lima (2006) revela distinta morfologia entre espécimes de *S. hilarii* proveniente das bacias do rio São Francisco e Alto rio Paraná (chamaremos de grupo leste) em comparação aos espécimes encontrados nas bacias do Tocantins-Araguaia, Alto Amazonas e Orinoco (denominaremos de grupo oeste). Segundo Lima (2006), os espécimes do grupo oeste podem ser diferenciados das demais espécies pela presença de pequenas e

numerosas listras escuras longitudinais, concentradas na porção média e central da nadadeira caudal. Com essa sinapomorfia, o autor propõe ressuscitar, para os espécimes do grupo oeste, o uso do nome *Salminus iquitensis* (nova combinação feita a partir de *Holobrycon iquitensis* - NAKASHIMA, 1941), considerado erroneamente por autores mais antigos (ver LIMA, 2006) como sinônimo de *S. hilarii* e assim influenciando diversos outros autores (MALDONADO-OCAMPO; VARI; USMA, 2008; SILVANO et al., 2001; WRIGHT; FLECKER, 2003). Dados moleculares também corroboram a hipótese de que os grupos leste e oeste são unidades taxonômicas diferentes (ABE et al., 2014). Entretanto, como o *S. iquitensis* não foi ressuscitado, não iremos considerá-lo como espécie neste trabalho.

Além desse problema taxonômico, outras incertezas permeiam a classificação das espécies do gênero como as variações morfológicas intraespecíficas. Shibatta e Garavello (1993), analisando espécimes de *S. hilarii* da bacia do rio São Francisco e Alto rio Paraná, sugeriram que as diferenças morfológicas encontradas na análise de componentes principais são suficientes para separar os espécimes de cada bacia em unidades taxonômicas distintas. A espécie *S. brasiliensis* também apresenta registros de variação morfológica. Rosso et al. (2012), usando caracteres merísticos e morfológicos, juntamente com dados moleculares mitocondriais (DNAmít), concluíram que espécimes coletados na Planície dos Pampas (Argentina) constituem uma nova unidade taxonômica distinta das demais espécies de *Salminus*. Em contraste, Lima (2006) afirma que, apesar dos polimorfismos morfológicos observados em seu trabalho, não há evidências que permita diagnosticar a presença de novas espécies. O autor justifica que as variações entre as populações decorrem da ampla e disjunta distribuição das espécies e que uma análise morfométrica mais precisa e um estudo filogeográfico são essenciais para a elucidação destas dúvidas.

Se a taxonomia de *Salminus* inspira cuidados, as relações filogenéticas com os demais Characiformes são ainda mais difíceis de serem estabelecidas. Apesar de ter sido proposta a subfamília Salmininae (EIGENMANN, 1917<sup>4</sup> apud LIMA, 2006), Lima et al. (2003) classificaram *Salminus*, juntamente com outros 87 gêneros da família Characidae, como *incertae sedis* (termo da Taxonomia que significa “posição incerta”, quer dizer sem atribuição de subfamília). Mirande (2010) analisando 360 caracteres, removeu o gênero do grupo proposto por Lima et al. (2003) e o classificou novamente em sua própria subfamília. Dados moleculares também corroboraram essa hipótese (JAVONILLO et al., 2010). Entretanto, Géry (1977), Ortí e Meyer (1997) e Calcagnotto et al. (2005) sugeriram que a estreita relação

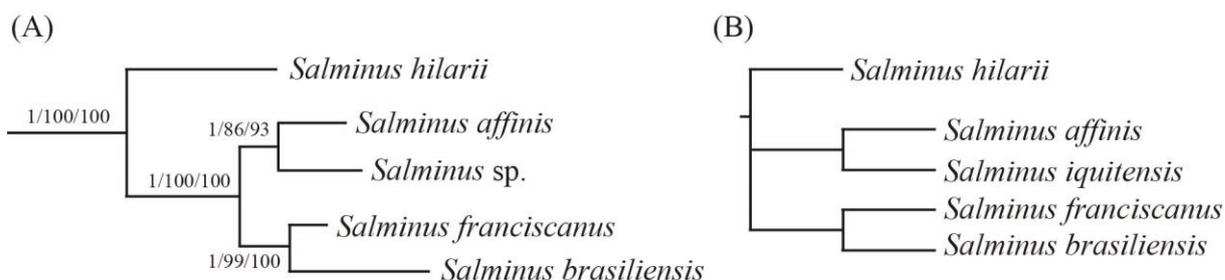
---

<sup>4</sup> EIGENMANN, C. H. The American Characidae [Vol. I]. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology*, v. 43, n. 1, p. 1-102, 1917.

observada, inclusive em dados citogenéticos (MARGARIDO; GALETTI, 1999) entre *Salminus* e *Brycon* não era de monofilia recíproca (gêneros irmãos), mas sim porque *Salminus* está interespaçado entre as espécies de *Brycon*, constituindo a subfamília Bryconinae. Mais recentemente, Abe et al. (2014), corroborando com Oliveira et al. (2011), promoveram um novo rearranjo realocando o gênero *Salminus* para família Bryconidae, juntamente com os gêneros *Chilobrycon*, *Henochilus* e *Brycon*, este último é o único gênero não monofilético.

A monofilia de *Salminus* é evidente e bem suportada por dados moleculares e morfológicos (15 sinapomorfias) (ABE et al., 2014; CALCAGNOTTO; SCHAEFER; DESALLE, 2005; JAVONILLO et al., 2010; LIMA, 2006; OLIVEIRA et al., 2011). As relações intragenéricas entre as espécies revelam *S. hilarii* (grupo leste) como a espécie-irmã das demais (Figura 4A). *S. brasiliensis* e *S. franciscanus* formam espécies-irmãs assim como *S. affinis* e *S. sp.* (= *S. iquitensis* = *S. hilarii*, grupo oeste) (ABE et al., 2014). Esse cenário é semelhante ao proposto por Lima (2006), que apesar de utilizar 69 caracteres morfológicos e apenas três apresentarem variações, identificou estreitas relações entre *S. brasiliensis* e *S. franciscanus*, e *S. affinis* e *S. iquitensis* (= *S. hilarii*, grupo oeste) (Figura 4B).

Figura 4 – Relações intragenéricas entre as espécies de *Salminus*, (A) baseadas em dados moleculares (ABE et al., 2014) e (B) dados morfológicos (LIMA, 2006).



Quanto ao status de conservação, todas as espécies de *Salminus* estão passando por um severo declínio populacional resultante da pesca predatória, introdução de espécies e, principalmente, fragmentação de habitat (construção de barragens hidrelétricas) (AGOSTINHO, 1999; CAROLSFELD, 2003). Apesar desse cenário alarmante, nenhuma das espécies válidas, presentes no território brasileiro, está incluída em listas de espécies ameaçadas internacional (IUCN, 2014) e nacional (IBAMA, 2014). A ausência de uma clara delimitação taxonômica resultou em uma negligência na organização das listas.

Diante desse complexo cenário taxonômico e da necessidade de rápida resolução para estabelecimento de políticas de conservação, *Salminus* é um grupo de peixes Neotropicais que

pode se beneficiar com a abordagem do DNA *barcoding*, um sistema de identificação molecular de espécies (HEBERT et al., 2003).

#### 2.4 DNA *barcoding*: ferramenta para identificação molecular

Historicamente, os métodos de identificação, denominação e classificação dos peixes, assim como ocorre com *Salminus*, estão baseados na morfologia externa. Entretanto, essa abordagem apresenta limitações que resultam em erros de identificação de espécies, quando: há a ocorrência de plasticidade fenotípica, presença de espécies crípticas, as chaves de identificação utilizadas frequentemente demandam de um alto nível de expertise e caracteres morfológicos considerados diagnóstico são efetivos apenas em um tipo específico de estágio de vida e gênero (HEBERT et al., 2003). Com esses impedimentos, associados também à diminuição na formação de novos taxonomistas (processo conhecido como “impedimento taxonômico”), tornou-se necessário o surgimento de uma nova abordagem para auxiliar na diagnose do status taxonômicos dos organismos.

A identificação de espécies através de outras ferramentas, como por exemplo, análises moleculares, tem sido utilizada há anos. Inicialmente, foram empregadas diferenças proteicas (MANWELL; BAKER, 1963), seguidas de análises citogenéticas (PETITPIERRE, 1996), chegando até a divergência de sequências de DNAmít (AVISE, 1994) e nuclear (SEVILLA et al., 2007). O uso da distância genética para essa finalidade foi discutido por Ferguson (2002). Segundo o autor, com algumas exceções, uma distância genética suficiente reflete um acúmulo de diferenças genéticas em vários *loci* ao longo do tempo, acarretando uma incompatibilidade genética entre os organismos e criando assim um isolamento reprodutivo (base para o conceito biológico de espécie). Diante dessa ideia, Hebert et al. (2003) propuseram, através do emprego de um marcador molecular mitocondrial, a criação de um sistema de bioidentificação global de animais, denominado DNA *barcoding*.

Segundo os autores, cada espécie analisada apresentaria um “código de barras” (*barcode*) próprio, um fragmento do gene Citocromo C Oxidase I (COI), que seria utilizado como uma ferramenta auxiliar na correta identificação taxonômica dos organismos e no aumento da descoberta de novas espécies (HEBERT et al., 2003; MORITZ; CICERO, 2004). A princípio não havia nenhuma razão para focar as análises em um gene específico, porém se uma região mitocondrial que codificasse proteína fosse escolhida, esta resultaria em características importantes para a metodologia: ausência de íntrons, ocorrência rara de recombinação e ausência de inserções e deleções (*indels*). O gene COI foi escolhido porque

além dessas características, apresentava duas outras vantagens: existência de *primers* universais robustos, amplificando em muitos, se não todos, os filos animais (FOLMER et al., 1994; ZHANG; HEWITT, 1997) e a variação do sinal filogenético apresentada pelo gene permitiria discriminar não apenas espécies estreitamente relacionadas, mas também grupos filogeográficos dentro da mesma espécie (HEBERT et al., 2003).

Dados da literatura também sugerem outros segmentos gênicos sendo utilizados em animais com o mesmo fim, como 16S e o citocromo B (VENCES et al., 2005; SEVILLA et al., 2007). Para plantas, as baixas taxas de substituições do DNA mitocondrial levaram à procura de regiões alternativas do genoma para o DNA *barcoding*. A CBOL Plant Working Group (2009) recomendou, após a avaliação de sete regiões candidatas do genoma dos plastos, que a combinação de duas regiões (rbcL – ribulose bifosfato carboxilase - e matK – maturase K) providenciaria uma identificação universal para as plantas terrestres.

A metodologia ganhou relevância em 2004, após a criação do *Consortium for the Barcode of life* (CBOL). Essa iniciativa internacional tem como objetivo desenvolver novos instrumentos e processos que torne a metodologia barata, rápida e fácil de utilizar. Por se tratar de um sistema de bioidentificação global, o primeiro passo foi o desenvolvimento de um banco de dados contendo sequências do gene COI (perfis-COI) da biodiversidade conhecida. A criação da BOLD (*Barcode of Life Database*) facilitou o processo de automação de identificação de espécies e tornou a metodologia acessível a qualquer usuário (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007), onde a alimentação do banco de dados é feita pelos próprios grupos de pesquisa. Para que a informação seja acurada e reprodutível, a BOLD listou sete elementos imprescindíveis para a criação dos perfis-COI: nome da espécie válida, dados do *voucher* (espécime testemunho), instituição onde o *voucher* está presente, informações sobre o identificador do espécime, sequência COI com no mínimo 500 pares de base (pb), *primers* utilizados e os eletroferogramas (*forward* e *reverse*) (HUBERT; HANNER, 2015).

A análise clássica de DNA *barcoding* é simples e está baseada na distância e similaridade genética entre os pares de sequências, utilizando o modelo de evolução Kimura-2-parâmetros (K2P), modelo de substituição livre de parâmetros para transições e transversões, representando a melhor métrica quando as distâncias são baixas (COLLINS et al., 2012), e o algoritmo de *Neighbor-Joining* (NJ) (HEBERT et al., 2003). Em geral, indivíduos da mesma espécie possuem uma distância genética (intraespecífica) menor do que quando comparado com indivíduos de outras espécies (distância interespecífica) (HEBERT et al., 2004). Para quantificar essa relação (distância intraespecífica x distância interespecífica),

a princípio, foi estipulado um valor limite (*threshold*) de 2% (HEBERT et al., 2003). Isso quer dizer que as espécies identificadas pela metodologia apresentariam distâncias intraespecíficas menores que 2% e distâncias interespecíficas maiores que 2%. Porém, como as espécies apresentam história evolutivas diferentes não seria possível padronizar um *threshold* para toda a biodiversidade. Então, Hebert et al. (2004) propuseram que para o grupo de estudo, o *threshold* utilizado para definir o limite de espécie e indicar novas unidades deve ser dez vezes a média intraespecífica. Ao aplicar esse limite em seu estudo, os autores identificaram corretamente 90% das 260 espécies de aves analisadas (média intraespecífica de 0.27%; *threshold* de 2.7% - HEBERT et al., 2004).

Além da identificação e descoberta de novas espécies, o DNA *barcoding* apresenta várias aplicabilidades, ganhando assim vários adeptos a metodologia. Na área de conservação da biodiversidade é capaz de atuar na identificação de ovos, larvas e formas juvenis de espécies ameaçadas obtidas, por exemplo, no comércio ilegal (COSTA; CARVALHO, 2007; ARDURA; LINDE; MOREIRA et al., 2010). Na ecologia, através da identificação da dieta, a partir do conteúdo estomacal ou de fezes, que visa analisar como os hábitos alimentares das diferentes espécies afetam a comunidade (VALENTINI et al., 2009). Na biossegurança, a identificação dos organismos pode ser efetiva no controle de pragas na agricultura, espécies invasoras e monitoramento da água (ARMSTRONG; BALL, 2005).

Apesar da metodologia ser empregada com sucesso em vários grupos de animais (pássaros - HEBERT et al., 2004; peixes - WARD et al., 2005; borboletas - JANZEN et al., 2009; répteis - NAGY et al., 2012), várias críticas têm sido levantadas. Algumas são metodológicas tais como a escolha do modelo de substituição (COLLINS et al., 2012) e o marcador mitocondrial (problemas quanto a introgressão, presença de pseudogenes, retenção de polimorfismo ancestral) (MORITZ; CICERO, 2004). Enquanto outras são conceituais, como: distinguir indivíduos de espécies que apresentam profunda estrutura filogeográfica (populações isoladas apresentam alta divergência intraespecífica – FRÉZL; LEBLOIS, 2008) e se o DNA *barcoding* está identificando espécies ou entidades moleculares (BLAXTER et al., 2005).

Todas essas críticas são válidas e discutidas por Collins e Cruickshank (2013), que, inclusive, propõem possíveis soluções. Na verdade, definir uma espécie biológica não é uma tarefa fácil e por isso a designação não deve ser baseada em uma única categoria. Ou seja, o DNA *barcoding* apesar de representar uma poderosa ferramenta para a taxonomia, sem a integração com outras abordagens (Taxonomia Integrativa – DAYRAT, 2005), torna-se

simplesmente um identificador de unidades moleculares (FERRI et al., 2009; GALIMBERTI et al., 2012).

Diante do exposto acima, o atual estudo propõe analisar a distribuição da variação genética das espécies do gênero *Salminus*, através da utilização de marcadores moleculares nucleares e mitocondriais, visando inferir sobre relações filogenéticas e padrões filogeográficos do grupo. Assim, estaremos contribuindo para o conhecimento da história evolutiva do gênero. Estas informações ainda poderão servir de subsídios para auxiliar tanto na definição do status taxonômicos das espécies do grupo, que se apresenta bastante confuso, quanto em programas de manejo e conservação, através na identificação de linhagens isoladas historicamente.

### 3. Referências bibliográficas

ABE, K. T. et al. Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. **BMC evolutionary biology**, v. 14, p. 152, 2014.

AB'SABER, A. N. O problema das conexões antigas e a separação da drenagem do Paraíba e Tietê. In: ED. **Boletim Paulista de Geografia**, v. 26, p. 38-49, 1957.

ALBERT, J. S.; LOVEJOY, N. R.; CRAMPTON, W. G. R. Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 21, p. 14–27, 2006.

AGOSTINHO, A. A. et al. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: TUNDISI, J. G.; STRASKRABA, M. **Theoretical reservoir ecology and its applications**. São Carlos: International Institute of Ecology, 1999. p. 227–265.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. Introduction to Neotropical freshwaters. In: \_\_\_\_\_. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley: University of California Press, 2011. p. 3–19.

ARDURA, A. et al. DNA Barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation**, v. 143, p. 1438-1443, 2010.

ARMSTRONG, K. F.; BALL, S. L. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 360, p. 1813-1823, 2005.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994. 684 p.

AVISE, J.C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000. 446 p.

BARLUENGA, M. et al. Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. **Nature**, v. 439, p. 719-723, 2006.

BERMINGHAM, E.; MARTIN, P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: Testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central

America. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 499–517, 1998.

BLAXTER, M. et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 360, p. 1935–1943, 2005.

BUCKUP, P. A. The Eastern Brazilian Shield. In: ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley: University of California Press, 2011. p. 203–210.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 135–153, 2005.

CAROLSFELD, J. et al. Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, Washington, DC, Estados Unidos da América, 2003. 372 p.

CARVALHO, T. P.; ALBERT, J. S. The Amazon-Paraguay divide. In: ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley: University of California Press, 2011. p. 193–202.

CBOL PLANT WORKING GROUP. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 106, p. 12794–12797, 2009.

COBBOLD, P. R.; MEISLING, K. E.; MOUNT, V. S. Reactivation of an obliquely rifted margin, Campos and Santos basins, southeastern Brazil. **The American Association of Petroleum Geologists Bulletin**, v. 85, n. 11, p. 1925–1944, 2001.

COHEN, K. M. et al. The ICS International Chronostratigraphic Chart. **Episodes**, v. 36, p. 199–204, 2013. Disponível em:  
<<http://www.stratigraphy.org/ICSchart/ChronostratChart2016-04.pdf>>. Acesso em: abr. 2016.

COLLINS, R. A. et al. Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, p. 457–465, 2012.

COLLINS, R. A.; CRUICKSHANK, R. H. The seven deadly sins of DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 6, p. 969–975, 2013.

COOKE, G. M.; CHAO, N. L.; BEHEREGARAY, L. B. Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia: The biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). **Journal of Biogeography**, v. 39, n. 4, p. 724–738, 2011.

COSTA, J. B. S. et al. Tectonics and paleogeography along the Amazon river. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 14, p. 335–347, 2001.

COSTA, F. O.; CARVALHO, G. R. The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. **Genomics, Society and Policy**, v. 3, n. 2, p. 29–49, 2007.

CRISCI, J. V.; KATINAS, L.; POSADAS, P. **Historical Biogeography: An Introduction**. Cambridge, MA: Harvard University Press, 2003. 250 p.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 407–415, 2005.

ESTEVEZ, K. E.; PINTO-LOBO, A. V. Feeding pattern of *Salminus maxillosus* (Pisces, Characidae) at cachoeira das Emas, Mogi-Guaçu river (São Paulo State, Southeast Brasil). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 2, p. 267–276, 2001.

FERGUSON, J. W. H. On the use of genetic divergence for identifying species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 75, p. 509–516, 2002.

FERRI, E. et al. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). **Frontiers in zoology**, v. 6, doi:10.1186/1742–9994–6–1, 2009.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–299, 1994.

FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727–736, 2008.

GALIMBERTI, A. et al. Integrated operational taxonomic units (IOTUs) in echolocating bats: A bridge between molecular and traditional taxonomy. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e40122, 2012.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: T.F.H. Publications, 1977. 672 p.

HAFFER, J. General aspects of the refuge theory. In: PRANCE, G. T. **Biological Diversification in the Tropics**. New York: Columbia University Press, 1982. p. 6–24.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**, v. 270, p. 313–321, 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, p. e312, 2004.

HO, S. Y. W. et al. Biogeographic calibrations for the molecular clock. **Biology Letters**, v. 11, 20150194, 2015.

HUBERT, N. et al. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2488–2503, 2007a.

HUBERT, N. et al. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: Implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2115–2136, 2007b.

HUBERT, N.; HANNER, R. DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. **DNA Barcodes**, v. 3, p. 44–58, 2015.

HUBERT, N.; RENNO, J-F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, p. 1414–1436, 2006.

IBAMA. Lista de espécies ameaçadas. Disponível em:  
<<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>>. Acesso em: nov. 2015.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. Disponível em:  
<<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: nov. 2015.

JANZEN, D. H. et al. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. Suppl. 1, p. 1–26, 2009.

JAVONILLO, R. et al. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 498–511, 2010.

KOMINZ, M. A. et al. Late Cretaceous to Miocene sea-level estimates from New Jersey and Delaware coastal plain coreholes: A error analysis. **Basin Research**, v. 20, p. 211-226, 2008.

LIEBERMAN, B. S. **Paleobiogeography: Using Fossils to Study Global Change, Plate Tectonics, and Evolution**. New York: Kuler Academica Press, 2000. 208 p.

LIMA, F. C. T. **Revisão taxonômica e relações filogenéticas do gênero *Salminus* (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae)**. 2006. 253 p. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIMA, F. C. T.; BRITSKI, H. A. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 237–244, 2007.

LIMA, F. C. T. et al. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, 2003. p. 106-169.

LISIECKI, L. E.; RAYMO, M. E. A Pliocene–Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic  $\delta^{18}\text{O}$  records. **Paleoceanography**, v. 20, PA1003, doi:10.1029/2004PA001071, 2005.

LOMOLINO, M. V.; SAX, D.; BROWN, J. H. **Foundation of Biogeography: new directions in the geography of nature**. Massachusetts, Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2004. 436 p.

LOVEJOY, N. R.; BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P. Marine incursion into South America. **Nature**, v. 396, p. 421–422, 1998.

LOVEJOY, N. R.; DE ARAÚJO, M. L. G. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 259–268, 2000.

LOVEJOY, N. R.; WILLIS, S. C.; ALBERT, J. S. Molecular signatures of Neogene biogeographical events in the Amazon fish fauna. In: HOORN, C.; WESSELINGH, F. **Amazonia - Landscape and species evolution: A look into the past**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 405-417.

LUJAN, N. K.; ARMBRUSTER, J. W. The Guiana Shield. In: ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley: University of California Press, 2011. p. 211–224.

LUNDBERG, J. G. Freshwater fishes and their paleobiotic implications. In: KAY, R. F. et al. **Vertebrate Paleontology in the Neotropics the Miocene Fauna of la Venta, Colombia**. Washington, D.C: Smithsonian Institution Press, 1997. p. 67–91.

LUNDBERG, J. G. et al. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American Rivers. In: MALABARBA L. R. et al. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs, 1998. p. 13–48.

MALDONADO-OCAMPO, J. A.; VARI, R. P.; USMA, J. S. Checklist of the Freshwater Fishes do Colombia. **Biota Colombiana**, v. 9, n. 2, p. 143-237, 2008.

MANWELL, C.; BAKER, C. M. A. A sibling species of sea cucumber discovered by starch gel electrophoresis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 10, p. 39-53, 1963.

MARGARIDO, V. P.; GALETTI JR., P. M. Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 357-361, 1999.

MILLER, K. G. et al. The Phanerozoic record of global sea-level change. **Science**, v. 310, p. 1293-1298, 2005.

MILLER, K. G. et al. A 180-million-year record of sea level and ice volume variations from continental margin and deep-sea isotopic records. **Oceanography**, v. 24, n. 2, p. 40–53, 2011.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the Family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 3, p. 385-568, 2010.

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

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: Promise and pitfalls. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, p. 1529–1531, 2004.

NAGY, Z. T. et al. First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, doi:10.1371/journal.pone.0034506, 2012.

NAKASHIMA, S. Algunos peces del Oriente peruano. **Boletín del Museo de Historia Natural “Javier Prado”**, v. 5, n. 16, p. 61-78, 1941.

OLIVEIRA, C. et al. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 275, 2011.

ORTÍ, G.; MEYER, A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Systematic Biology**, v. 46, n. 1, p. 75-100, 1997.

PETITPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the coleoptera. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 25, n. 1-2, p. 115-134, 1996.

POSADAS, P.; CRISCI, J. V.; KATINAS, L. Historical biogeography: A review of its basic concepts and critical issues. **Journal of Arid Environments**, v. 66, p. 389–403, 2006.

POTTER, P. E. The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a natural history. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 10, n. 5-6, p. 331–344, 1997.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). **Molecular Ecology Note**, v. 7, p. 355-364, 2007.

RENNO, J-F. et al. Intraspecific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and Brazil: a genetic approach to the refuge theory. **Journal of Fish Biology**, v. 36, p. 85–95, 1990.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P. ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, doi:10.1111/jfb.13016, 2016.

RIBEIRO, A. C. 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**, v. 4, n. 2, p. 225–246, 2006.

RIBEIRO, A. C. et al. Distributions and phylogeographic data of rheophilic freshwater fishes provide evidences on the geographic extension of a central-brazilian amazonian palaeoplateau in the area of the present day Pantanal Wetland. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 319-326, 2013.

RICCOMINI, C.; SANT'ANNA, L. G.; FERRARI, A. L. Evolução geológica do *Rift* continental do sudeste do Brasil. In: MANTESSO-NETO, V. et al. **Geologia do continente Sul-Americano: Evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida**. São Paulo, Editora Beca, 2004. p. 383-405.

ROSSETI, D. F. VALERIANO, M. M. Evolution of the lowest amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. **Catena**, v. 70, p. 253-265, 2007.

RODRÍGUEZ-OLARTE, D.; TAPHORN, D. C. Abundance, feeding and reproduction of *Salminus* sp. (Pisces: Characidae) from mountain streams of the Andean piedmont in Venezuela. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 73-79, 2006.

ROSSO, J. J. et al. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, p. 999-1011, 2012.

ROXO, F. F. et al. Molecular phylogeny and biogeographic history of the armored neotropical catfish subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyriinae (siluriformes: loricariidae). **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105564, 2014.

RULL, V. Speciation timing and Neotropical biodiversity: The Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 11, p. 2722-2729, 2008.

SEVILLA, R. G. et al. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 730-734, 2007.

SHIBATTA, O. A.; GARAVELLO, J. C. Estudo da variação geográfica em *Salminus hilarii* Valenciennes, 1849, das Bacias do Alto Paraná e São Francisco, através da análise morfométrica multivariada em componentes principais. **Naturalia**, v. 18, p. 109-116, 1993.

SILVANO, R. A. M. et al. **Peixes do Alto Rio Juruá (Amazônia, Brasil)**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo – Edusp, 2001. 300 p.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTI, G. Population structure and biogeography

of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 407–417, 2001.

SMITH, A. G.; D. G. SMITH; FUNNELL, B. M. **Atlas of Mesozoic and Cenozoic Coastlines**. Cambridge University Press, 1994. 112 p.

TAGLIACOLLO, V. A. et al. Biogeographical signature of river capture events in Amazonian lowlands. **Journal of Biogeography**, v. 42, n. 12, p. 1–14, 2015.

VALENTINI, A. et al. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 51–60, 2009.

VENCES, M. et al. Comparative performance of the 16s rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**, v. 2, p. 5, doi: 10.1186/1742-9994-2-5, 2005.

WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B: Biological sciences**, v. 360, p. 1847–1857, 2005.

WEITZMAN, S. H.; WEITZMAN, M. J. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. In: PRANCE, G. T. **Biological Diversification in the Tropics**. New York: Columbia University Press, 1982. p. 403–422.

WHITTAKER, R. J. et al. Conservation Biogeography: assessment and prospect. **Diversity and Distributions**, v. 11, p. 3–23, 2005.

WILEY, E. O. Vicariance Biogeography. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 19, p. 513–542, 1988.

WRIGHT, J. P.; FLECKER, A. S. Deforesting the riverscape: the effects of wood on fish diversity in a Venezuelan piedmont stream. **Biological Conservation**, v. 120, n. 3, p. 439–447, 2004.

ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. **Insect Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 143–150, 1997.

#### 4. Perguntas e Hipóteses

Com base nas lacunas de informações apresentadas na fundamentação teórica para o gênero *Salminus* três perguntas originaram nosso estudo.

Pergunta 1: As divergências morfológicas observadas nas espécies *S. hilarii* e *S. brasiliensis* são resultados de linhagens divergentes?

A nossa hipótese nula é que as divergências morfológicas observadas nas espécies *S. hilarii* e *S. brasiliensis* não são resultados de linhagens divergentes, representando assim polimorfismos intraespecíficos, comuns em espécies com ampla distribuição. Para testar essa hipótese empregaremos a metodologia de DNA *barcoding* que avaliará se a divergência genética apresentada por *S. hilarii* e *S. brasiliensis* é inferior à diversidade genética encontrada entre espécies. Caso seja refutada (hipótese alternativa), *Salminus* é constituído por mais unidades moleculares e seu status taxonômico precisa ser reavaliado.

Pergunta 2: Quais foram os eventos históricos responsáveis pelos processos de diversificações do gênero *Salminus*?

Devido à ampla e disjunta distribuição das espécies de *Salminus* nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, nossa hipótese é que os eventos de vicariância foram os responsáveis pelos processos de diversificação do gênero. Para determinar a sequência de eventos responsáveis pela diversificação das espécies de *Salminus* nós reconstruímos a filogenia do gênero, com base em marcadores mitocondriais e nucleares, estimamos o tempo de divergência e relacionamos com os eventos geológicos que mudaram a paisagem hidrológica.

Pergunta 3: É possível distinguir entre as assinaturas filogeográficas dos eventos de vicariância e geodispersão?

Apesar de refletirem distintos padrões biogeográficos, vicariância e geodispersão podem apresentar mesma assinatura filogenética em casos de reestabelecimento de barreiras. Nossa hipótese é que evento de geodispersão apresente como assinatura filogeográfica marcada por um evento fundador. Para testar essa hipótese, empregamos a computação bayesiana aproximada (ABC) para distinguir entre as assinaturas filogeográficas dos eventos e assim testar hipóteses alternativas que influenciaram a história evolutiva de peixes sul-americanos.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo geral

Avaliar, por meio de filogenia molecular, a sistemática vigente para o gênero *Salminus*, para examinar as relações evolutivas entre as espécies e inferir sobre os eventos biogeográficos que influenciaram o padrão atual de distribuição geográfica do gênero.

### 5.2 Objetivo específicos

- Empregar o DNA *barcoding* para delimitar as espécies do gênero *Salminus*;
- Propor uma filogenia molecular para as espécies do gênero utilizando marcadores moleculares (mitocondrial e nuclear);
- Analisar os padrões filogeográficos inferidos para *Salminus*, com a finalidade de compreender a influência dos processos históricos, climáticos e geológicos na distribuição da atual do gênero.
- Utilizar abordagem bayesiana baseada em modelos para testar hipóteses alternativas e distinguir entre as assinaturas filogeográficas de vicariância e geodispersão na história evolutiva de peixes sul-americanos.

**Capítulo 1**

DNA *barcoding* revela incertezas taxonômicas em *Salminus*  
(Characiformes)

(Aceito na revista *Systematics and Biodiversity*)



Machado, C.B., Ishizuka, T.K., Freitas, P.D., Valiati, V.H. & Galetti Jr., P.M. DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characidae). *Systematics and Biodiversity*, no prelo.

DNA *barcoding* revela incertezas taxonômicas em *Salminus* (Characiformes)

Carolina de Barros Machado da Silva<sup>1\*</sup>, Tamylin Kaori Ishizuka<sup>1</sup>, Patrícia Domingues de Freitas<sup>1</sup>, Victor Hugo Valiati<sup>2</sup> & Pedro Manoel Galetti Jr<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235 - SP-310, São Carlos, SP, 13565-905, Brasil. Phone: +55 163351-8309

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo, RS, 93022-000, Brasil. Phone: +55 513591-1100

E-mails: carolbioms@gmail.com\*, tamylin@gmail.com, patdf@ufscar.br, valiati@unisinus.br, galettip@ufscar.br

Título curto: Revelando incertezas taxonômicas em *Salminus*

## Resumo

*Salminus* é um gênero constituído por quatro espécies de peixes migratórios e predadores topo de cadeia alimentar. Embora seja um grupo com grande importância econômica e ecológica, sua taxonomia não está completamente esclarecida. O objetivo deste estudo foi detectar se os problemas taxonômicos previamente verificados são consequências de linhagens divergentes dentro das espécies. Em caso afirmativo, nós queremos saber se essas divergências são suficientes para sinalizar táxons potencialmente não descritos. Para isso, nós empregamos as análises tradicionais do DNA *barcoding* e GMYC (*generalized mixed Yule-coalescent*) baseadas no gene COI e reconstrução de Inferência Bayesiana (IB) para o marcador nuclear RAG2 em todas as espécies de *Salminus* atualmente reconhecidas, com uma amostragem distribuída por diferentes bacias hidrográficas. Oito MOTUs (*Molecular Operation Taxonomic Units*) foram determinadas por ambas metodologias, e recuperadas nas análises topográficas do gene COI com *Neighbor-Joining* (NJ) e IB. Apenas *S. affinis* e *S. franciscanus* formaram haplogrupos monofiléticos. *S. brasiliensis* e *S. hilarii* apresentam, respectivamente, duas e quatro linhagens mitocondriais distintas e distâncias intraespecíficas, baseada em K2P (Kimura 2-Parâmetros), maiores que o ótimo *threshold* (OT) estimado (1.1%). A árvore do gene nuclear RAG2 suportou apenas duas linhagens de *S. hilarii*, mas nenhuma do *S. brasiliensis*. Todas essas linhagens mitocondriais, para ambas as espécies, apresentam correspondência com os polimorfismos morfológicos descritos em estudos prévios. Nós sugerimos um novo cenário taxonômico constituído por seis espécies (*S. affinis*, *S. franciscanus*, *S. brasiliensis*, *S. hilarii*, *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*) e a necessidade desse novo conhecimento ser considerado nas políticas de conservação no território brasileiro para *Salminus*.

Palavras chaves: Análise GMYC, espécies-crípticas, marcador nuclear, MOTU, peixes neotropicais de água doce, polimorfismo morfológico.

## Introdução

A ictiofauna Neotropical de água doce é umas das mais diversas do mundo. Estimativas atuais indicam que essa diversidade pode ser ainda maior, uma vez que cerca de 30-40% dos peixes ainda não foram descritos (de Carvalho et al., 2011), principalmente devido à presença de espécies crípticas (Albert & Reis, 2011; Reis, Kullander, & Ferraris Jr., 2003). Para acelerar a descoberta de espécies, o DNA *barcoding* – que emprega um sistema de bioidentificação animal global através do uso de um marcador mitocondrial Citocromo C Oxidase I (COI; Hebert, Cywinska, Ball, & DeWaard, 2003) – tem sido proposto como uma estratégia viável e eficiente para ajudar revisões taxonômicas em peixes Neotropicais (Bellafronte, Mariguela, Pereira, Oliveira, & Moreira-Filho, 2013; Costa-Silva, Rodriguez, Roxo, Foresti, & Oliveira, 2015; de Carvalho et al., 2011; Pereira, Hanner, Foresti, & Oliveira, 2013; Pereira, Maia, Hanner, Foresti, & Oliveira, 2011; Rosso, Mabragaña, González Castro, & Díaz de Astarloa, 2012). Embora empregado com sucesso em protocolos de identificação e delimitação de vários grupos de animais (aves, Hebert, Stoeckle, Zemplak, & Francis, 2004; borboletas, Janzen et al., 2009; répteis, Nagy, Sonet, Glaw, & Vences, 2012; peixes, Ward, Zemplak, Innes, Last, & Hebert, 2005), atualmente, a metodologia é frequentemente utilizada como um componente de abordagens integrativas para a delimitação de espécies (Dayrat, 2005), juntamente com o uso de marcadores nucleares.

O gênero *Salminus* tem sido identificado como um dos grupos de peixes Neotropicais que pode vir a ser beneficiado com a abordagem de DNA *barcoding*. Considerado um gênero monofilético da família Bryconidae (Oliveira et al., 2011), é constituído por peixes migratórios de médio e grande porte apreciados na pesca comercial e esportiva (Lima & Britski, 2007). As espécies de *Salminus* estão distribuídas por todas as principais bacias hidrográficas sul-americanas, ocorrendo em rios de primeira e segunda ordem. Os adultos são

predadores topo de cadeia apresentando um papel chave na dinâmica, funcionamento e estrutura dos ecossistemas de água doce. Apesar de sua importância ecológica e comercial, a taxonomia de *Salminus* é ainda pobremente resolvida (Lima & Britski, 2007).

Atualmente, quatro espécies são reconhecidas em *Salminus* (Lima & Britski, 2007; Lima et al., 2003): (i) *Salminus affinis* (Steindachner, 1880), restrita às bacias do rio Magdalena, Ranchería e Sinú, na Colômbia; (ii) *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), encontrada por toda bacia Platina (composta pelas bacias do Paraná, Paraguai e Uruguai) na Argentina, no Paraguai, Uruguai e Brasil, bacia do Iguazu e drenagem de Lagoa dos Patos no Brasil; (iii) *Salminus franciscanus* (Lima & Britski, 2007), endêmica da bacia do São Francisco, Brasil; e (iv) *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1850), distribuída nas bacias do Alto rio Paraná, São Francisco e Tocantins-Araguaia no Brasil, e nas bacias do Alto Amazonas e Orinoco no Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (Fig. 1).

Caracteres morfológicos têm sido tradicionalmente empregados para delimitar as espécies de *Salminus*. No entanto, a necessidade de empregar ferramentas adicionais para a identificação das espécies tornou-se evidente nos últimos anos. Variação intraespecífica em caracteres morfológicos empregados como diagnósticos, por exemplo, têm sido observados em *S. brasiliensis* e *S. hilarii* (Rosso et al., 2012; Shibatta & Garavello, 1993, respectivamente). Para *S. hilarii*, as diferenças morfológicas observadas ocorrem entre as bacias hidrográficas (Lima, 2006): espécimes das bacias hidrográficas do Tocantins-Araguaia, Alto Amazonas e Orinoco são diferentes daqueles encontrados no Alto rio Paraná e São Francisco. Essa diferença fenotípica é considerada pelo autor como suficiente para se dar um novo tratamento taxonômico aos dois grupos: ambos devem ser elevados ao nível de espécie. Shibatta e Garavello (1993), analisando apenas espécimes da bacia do Alto rio Paraná e rio São Francisco, também identificaram variação morfológica significativa entre espécimes de cada bacia hidrográfica, sugerindo a necessidade de mudanças taxonômicas para a espécie.

Diante dessas variações morfológicas entre bacias, é necessário identificar se dados moleculares igualmente suportam a existência de múltiplas linhagens evoluindo independentemente dentro do que atualmente é reconhecido como *S. hilarii*.

Polimorfismo morfológico também foi documentado para *S. brasiliensis*, que apresenta uma delimitação de espécie controversa. A lista de espécies de peixes de água doce da América do Sul (Lima et al., 2003), não suporta a presença de múltiplas linhagens dentro de *S. brasiliensis* e sinonimizou todos os nomes disponíveis na literatura. Entretanto, Rosso et al. (2012), utilizando dados merísticos e caracteres morfológicos, juntamente com dados moleculares (DNAMit), sugeriram que alguns espécimes coletados na Planície dos Pampas (Argentina) constituíam uma distinta espécie de *Salminus*.

Diante da complexa taxonomia do gênero, nós empregamos a análise tradicional de DNA *barcoding* e uma moderna abordagem quantitativa de delimitação de espécies (GMYC), juntamente com análises para um marcador nuclear (RAG2 – *Recombination Activating Gene* 2) para contribuir com a sistemática do grupo. Nós especificamente perguntamos se as diferenças morfológicas observadas em *S. hilarii* e *S. brasiliensis* correspondem a linhagens divergentes, e, se sim, se a quantidade de divergência genética observada é similar ao que é detectado entre as espécies nominais. Nós usaremos esses resultados para sinalizar potenciais táxons não descritos e para preencher lacunas de conhecimento que necessitem de atenção.

## **Material e Métodos**

### **Material amostrado**

Um total de 111 espécimes, representando as quatro espécies nominais e dois espécimes do gênero *Brycon* (grupo externo mais estreitamente relacionado a *Salminus* (Ortí e Meyer, 1997), foram coletados em distintas bacias hidrográficas da América do Sul, ou obtidos de

pesquisadores colaboradores (Tabela 1, Fig. 1). Amostras biológicas consistiram de fragmentos da nadadeira peitoral e apenas 23 vouchers, representando as espécies encontradas em diferentes regiões, foram depositados em coleções ictiológicas. Os demais espécimes foram devolvidos ao rio depois da coleta do tecido. A opção de devolução do animal ao habitat se deve ao atual status de conservação do gênero (redução acentuada dos estoques naturais devido às ações antrópicas). As informações dos espécimes estão publicamente disponíveis através no *Barcode of Life Data System* (BOLD), projeto DNA *barcoding* de *Salminus* (Characiformes), código PBS.

#### **Extração de DNA, amplificação, purificação e sequenciamento**

Nós extraímos o DNA genômico a partir do fragmento da nadadeira peitoral através da utilização do protocolo de precipitação salina, proposto por Aljanabi & Martinez (1997). Posteriormente, 700 pb (pares de base) foram amplificados da região 5' do gene COI utilizando os *primers* FishF1 e FishR1 (Ward et al., 2005). As reações de PCR ocorreram em um volume final de 25 µL contendo 16,9 µL de água mili-Q, 2,5 µL tampão 10X de PCR Invitrogen (1X), 2,5 µL dNTPs (0,25 mM), 1 µL MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 0,5 µL de cada *primer* (0,2 µM), 0,1 µL Platinum<sup>®</sup> Taq polimerase (0,5 unidade) e 1µL DNA (50ng/µL). As condições para amplificação do gene foi uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 52°C, 1 min a 72°C; finalizando a temperatura de extensão de 72°C por 10 min. Para amplificar 1000 pb do marcador nuclear RAG2, nós usamos os *primers*, reações e condições de reação da cadeia da polimerase (PCR) descritas por Oliveira et al. (2011). Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti<sup>®</sup> 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Após a verificação da amplificação em gel de agarose a 1%, todos os produtos de PCR foram purificados utilizando o protocolo de polietilenoglicol 20% (Kusukawa et al., 1990). Os fragmentos foram sequenciados em sequenciador automático

ABI3730XL, *Applied Biosystems*. As sequências e eletroferogramas (*trace files*) foram também depositados na BOLD. As sequências (COI e RAG2) estão também disponíveis GenBank (ver Tabela S1 para os números de acesso).

### **Análise de dados**

Nós alinhamos e editamos todas as sequências obtidas utilizando o software Geneious R7 v6.1.6 (Kearse et al., 2012) e as combinamos com sequências COI de referência das espécies *S. brasiliensis*, *S. franciscanus* e *S. hilarii* que já estão disponíveis no banco de dados da BOLD (as sequências referências recebem a identificação dos projetos a qual fazem parte, FARGB, FUPR e BSB, juntamente com uma numeração). Essas sequências de referência são consideradas “perfis *barcode*”, ou seja, seu status taxonômico já foi previamente confirmado através de análises morfológicas.

O critério para a delimitação de espécies através do DNA *barcoding* utiliza as informações de monofilia (baseado no método de construção topológica) e divergência genética. Em geral, os táxons definidos pela metodologia são congruentes com as espécies biológicas e apresentam baixa divergência intraespecífica e altas divergências interespecíficas (a diferença entre essas distâncias criaria uma lacuna, denominada de *Barcoding gap*) quando comparadas com o *threshold* adotado (Hebert et al., 2004). Para determinar o ponto de corte, nós evitamos o emprego de um valor padronizado, como o *threshold* de 2% adotado para a identificação dos peixes Neotropicais (Pereira et al., 2013), pois os táxons apresentam taxas mutacionais variáveis e diferentes histórias de vida. Nós, então, calculamos o valor, denominado de ótimo *threshold* (OT), de divergência molecular diretamente do nosso conjunto de dados, utilizando a função “localMinima”, um método experimental implementado no pacote SPIDER (*SPecies IDentity and Evolution in R*; Brown et al., 2012) para a plataforma R (<http://www.R-project.org>). Essa função é baseada no conceito de

*barcoding gap* (Meyer & Paulay, 2005). O gráfico de densidade das distâncias genéticas gerado apresentará uma depressão que representa o ponto onde ocorre a transição entre as distâncias intra e interespecíficas. A vantagem deste método é não necessitar de conhecimento *a priori* sobre a identidade das espécies para determinar o OT (Brown et al., 2012). Após estabelecer o OT, nós utilizamos o seu valor para obter as unidades taxonômicas operacionais moleculares no software jMOTU (Jones et al., 2011) (MOTUs, em inglês, *molecular operational taxonomic unit*; Blaxter et al., 2005; Galimberti et al., 2012). As MOTUs são agrupamentos de sequências que agem como representantes genômicos das entidades moleculares. Portanto, elas não representam as espécies, mas unidades moleculares, conceito comumente abordado no DNA *barcoding* (Casiraghi, Labra, Ferri, Galimberti, & de Mattia, 2010).

Nós usamos o Mega 6 (Tamura et al., 2013) para calcular as médias das distâncias genéticas intra e interespecífica, baseada no modelo de evolução Kimura 2-paramêtros (K2P) (Kimura, 1980). Uma topologia de *Neighbour-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) foi construída sob esse mesmo modelo com o objetivo de representar graficamente as divergências entre as espécies. O suporte dos clados foram avaliados por *Bootstrap* (1000 pseudo-réplicas), conforme Felsenstein (1985).

Todas as análises descritas acima são padrões nos estudos empregando DNA *barcoding*. Devido às críticas em relação ao uso do K2P como modelo de substituição (Meyer & Paulay, 2005), nós também utilizamos a distância p, como proposto por Collins, Boykin, Cruickshank e Armstrong (2012), e o melhor modelo indicado pelo *software* jModelTest 3.7 (K80+G; Posada, 2008). Diferenças entre os três modelos foram mínimas e estavam relacionadas a quantidade de divergência genética estimada e a configuração da topologia da árvore. Por esta razão, nós apenas mostraremos os resultados baseados no emprego do modelo de K2P.

Além da tradicional abordagem baseada em distância para delimitar os grupos de DNA mitocondrial (DNAmít), nós também utilizamos uma abordagem filogenética usando GMYC (*General mixed Yule Coalescent*). Este método explora, a partir de uma árvore ultramétrica, a diferença prevista nas taxas de ramificação entre os eventos de especiação e extinção (relações interespecíficas) e os eventos de coalescência (relações intraespecíficas), com base no comprimento dos ramos. Assim, o método detecta mudanças nos comprimentos dos ramos que estariam associados à transição entre especiação/extinção e coalescência, e consequentemente, aos limites específicos (Pons et al., 2006). A análise de GMYC necessita de uma árvore ultramétrica, que foi determinada usando o BEAST v.2.2.1 (Bouckaert et al., 2014) sob as seguintes condições: modelo de substituição calculado no Partition Finder 1.1.1 (será discutido a seguir), relógio molecular relaxado com uma distribuição de lognormal e o modelo de especiação *birth-death*, conforme sugerido por Costa-Silva et al. (2015). O modelo de GMYC foi conduzido no pacote SPLITS (*SPecies Limits by Threshold Statistics*; Monaghan et al., 2009) do R utilizando o método de *threshold* único, ou seja, detecta um único ponto de transição entre os processos de especiação/extinção e coalescência, e parâmetro de intervalo padrão (intervalo = c(1,10)). Devido ao fato do GMYC ser baseado em uma função de verossimilhança que está diretamente relacionada com processos evolutivos, o método proporciona um avanço no processo de delimitação de espécies baseado em dados moleculares.

Para testar se as conclusões fornecidas pela aplicação do DNA *barcoding* e GMYC, ambos baseados no gene COI, são replicadas quando marcadores adicionais (independentes) são empregados, nós realizamos a reconstrução da topologia do gene nuclear RAG2 através da abordagem de Inferência Bayesiana. Para isso, nós sequenciamos dois indivíduos de cada MOTU, identificada previamente pelas análises do DNAmít. Antes de proceder com as análises filogenéticas, nós checamos possíveis eventos de recombinação com RDP3.44

(Martin & Rybicki, 2000). Nós também avaliamos a saturação das substituições para ambos marcadores (COI e RAG2) através do Índice de saturação de substituição ( $I_{ss}$ ) baseado em entropia, estimado no DAMBE (Xia, Xie, Salemi, Chen, & Wang, 2003). Essa avaliação certifica se o nosso conjunto de dados é apropriado para reconstruções filogenéticas. Modelos de evolução e o melhor esquema de partição, incluindo partições por códon, foram determinadas no Partition Finder 1.1.1 usando o critério de informação bayesiana (Lanfear, Calcott, Ho, & Guindon, 2012).

Todas as análises bayesianas foram realizadas no BEAST v.2.2.1. Quatro cadeias independentes de Markov foram iniciadas a partir de árvores aleatórias e corridas com 10 milhões de gerações, com parâmetros e árvores sendo salvas a cada 1000 gerações. Para o *burn-in* foram descartadas 25% das topologias, e os arquivos de *log* e *tree* foram combinados utilizando LogCombiner v.1.8.0 (Drummond, Suchard, Xie, & Rambaut, 2012). A mixagem apropriada dos dados foi verificada com o Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond, 2007), e o tamanho efetivo da amostragem (ESS, em inglês, *effective sample size*) de 200 ou mais foi necessário para todos os parâmetros.

## Resultados

Depois do alinhamento e da edição das sequências, a média do comprimento dos 137 fragmentos do gene COI (111 sequências obtidas no presente estudo e 26 sequências do banco de dados da BOLD) foi 616 pb (variação de 534-647). Do total dos 647 pb analisados, 128 sítios foram polimórficos. A maioria dos sítios polimórficos ocorreram na terceira posição dos códons (88.64%, 117 sítios) não alterando o aminoácido produzido; apenas 11 mutações foram não sinônimas: duas mudanças na primeira posição do códon, uma na segunda e as demais mutações na terceira posição do códon. Nenhuma inserção, deleção ou *stop* códon foi

observado, suportando a hipótese de que todos os fragmentos são sequências funcionais do gene COI e não NUMTs (pseudogenes mitocondriais nucleares).

A função “LocalMinima” no SPIDER propôs um OT de 0.0112 (ou 1.1%) como o valor que acarreta na possível transição entre as distâncias intra e interespecíficas. Este valor não apresentou erros acumulativos (a soma entre falsos positivos e falsos negativos), calculados a partir da função “threshVal” do mesmo pacote. Duas espécies de *Salminus* apresentaram distâncias intraespecíficas maiores que o OT: *S. brasiliensis* (máxima de 8%, média de 3.6%) e *S. hilarii* (máxima de 11.1%, média de 5%, Tabela S2). Oito MOTUs foram identificadas usando o OT como o ponto de corte *barcode* no jMOTU. *Singletons* (MOTUS representadas por uma única sequência) não foram identificados. Apenas os espécimes de *S. affinis* e *S. franciscanus* representaram uma MOTU cada. Quatro e duas MOTUS correspondem as espécies válidas *S. hilarii* e *S. brasiliensis*, respectivamente.

Comparando os resultados das MOTUs com os haplogrupos obtidos pela árvore de NJ (Fig. 2.1), nós identificamos uma estreita relação entre eles. A topologia de NJ agrupou todas as sequências dentro de oito grandes haplogrupos fortemente suportados; apenas duas dessas linhagens monofiléticas correspondem as espécies atualmente reconhecidas: o haplogrupo 3 incluiu todos os indivíduos associados com a espécie nominal *S. affinis*, enquanto o haplogrupo 5 incluiu indivíduos reconhecidos como *S. franciscanus*. Os nomes *S. brasiliensis* e *S. hilarii* são atualmente utilizados para identificar pelo menos duas distintas linhagens mitocondriais estruturadas geograficamente que não formam grupos monofiléticos. Os haplótipos COI de *S. hilarii* estão divididos em quatro haplogrupos (1, 2, 7, 8), constituídos de espécimes da bacia amazônica (passará a ser denominado de *S. sp. Amazonas*, uma vez que o marcador nuclear também suporta que é uma unidade distinta daquela conhecida como *S. hilarii*), bacia do Tocantins-Araguaia (denominado *S. sp. Araguaia*, pelo mesmo motivo discutido anteriormente), bacia do São Francisco (*S. hilarii* 1), e bacias do Alto rio Paraná e

São Francisco (*S. hilarii* 2), respectivamente. Haplótipos de *S. brasiliensis* foram estruturados em dois haplogrupos: o haplogrupo 4 apresenta espécies provenientes das bacias do Uruguai e Paraguai e drenagem da Lagoa dos Patos (*S. brasiliensis* 1), e o haplogrupo 6 foi formado por peixes do Alto rio Paraná e 3 espécimes da bacia do Uruguai (*S. brasiliensis* 2).

Considerando os oito haplogrupos como as MOTUs, as médias das distâncias dentro de cada MOTU (intra-MOTU) foi menor que o OT. As médias das distâncias genéticas entre MOTUs (inter-MOTU) foram acima do 1.1%, mesmo quando as duas linhagens atualmente chamadas de *S. brasiliensis* (*S. brasiliensis* 1 e *S. brasiliensis* 2) e as quatro MOTUs atualmente associadas com o nome *S. hilarii* foram comparadas entre si. A distância inter-MOTU mais próxima do OT foi observada entre *S. hilarii* 1 e *S. hilarii* 2 (1.7%, Tabela 2).

Nós comparamos as máximas distâncias intraespecíficas e mínimas distâncias interespecíficas para cada espécie nominalmente reconhecida (Fig. 3) através da aplicação do *threshold* do DNA *barcoding*. Esta abordagem distribui as unidades taxonômicas em quatro quadrantes (Fig. 3). O quadrante I incluiu *S. affinis* e *S. franciscanus*, ambos apresentando distâncias intraespecíficas mais baixas que 1.1% e distâncias interespecíficas maiores que 1.1%. O quadrante II, frequentemente utilizado para sinalizar a potencial existência de espécies crípticas (Hebert et al., 2004), incluiu *S. brasiliensis* e *S. hilarii*, como reconhecidas atualmente, com distâncias intra e interespecíficas maiores que 1.1%. Nenhum grupo caiu nos quadrantes III e IV. O quadrante III é empregado para identificar casos de sinonímia, divergência recente e hibridizações (distâncias intra e interespecíficas <1.1%). O quadrante IV sinaliza casos de ausência de correspondência entre taxonomia e identificação baseada em DNAmIt (distância intraespecífica >1.1% e distância interespecífica <1.1%) (Hebert et al., 2004). Quando as oito MOTUS são consideradas, o quadrante I abriga todas elas (dados não apresentados).

Nenhum sinal de saturação foi observado entre os marcadores (COI  $I_{ss}= 0.118$ ,  $I_{ssc}=0.804$  para árvore simétrica,  $0.773$  para árvore não simétrica,  $p < 0.000$ ; RAG2  $I_{ss}=0.015$ ,  $I_{ssc}=0.759$  para árvore simétrica,  $0.579$  para árvore não simétrica,  $p < 0.000$ ). O modelo mais apropriado para a substituição de nucleotídeos, o qual foi particionado para cada marcador por códon, está na Tabela S3. Nós não detectamos evidências de recombinação para o RAG2.

Considerando *Brycon* sp. como o grupo externo, a máxima verossimilhança para o modelo de GMYC foi significativamente superior ( $L = 1458.26$ ) à verossimilhança do modelo nulo ( $L_0 = 1443.717$ ,  $p\text{-value } 0.000$ ). O único ponto de transição entre os processos de coalescência e especiação/ extinção, linha cinza vertical na Fig. 2.2, das análises de GMYC sugerem a presença de nove ML entidades (consideradas “espécies” para a análise) com um intervalo de confiança de 7-10. O GMYC recuperou os mesmos oito grandes haplogrupos identificados pela análise de NJ (Fig. 2.2). A nona entidade molecular foi constituída pelos espécimes de *Brycon* sp. Nesta análise bayesiana, *S.* sp. Amazonas recuperou aparentemente uma estruturação entre o rio Madeira (SI\_015, SI\_016 e SI\_017) e os rios Amazonas e Orteguaza (SI\_019, SI\_020, SI\_024 e SI\_026) (Fig. 2.2).

A topologia bayesiana no marcador nuclear, recuperou cinco clados com alta probabilidades posteriores, dos quais quatro corresponderam às MOTUs identificadas na árvore do gene COI: *S. affinis* (clado 1), *S.* sp. Araguaia (clado 2), *S.* sp. Amazonas (clado 3), *S. franciscanus* (clado 4) e um clado (5) constituído por espécimes *S. brasiliensis* 1, *S. brasiliensis* 2, *S. hilarii* 1 e *S. hilarii* 2 (Fig. 4). Neste último grupo, as relações entre essas MOTUs foram fracamente suportadas, com probabilidades posteriores inferiores a 40%.

## Discussão

As MOTUs nem sempre correspondem às espécies (conceito biológico – Coyne & Orr, 2004), porém a identificação das unidades taxonômicas moleculares é uma abordagem preliminar poderosa no DNA *barcoding* porque não é afetada pela nomenclatura vigente, servindo como um ponto de partida para auxiliar nas abordagens de delimitação de espécies (Blaxter et al., 2005). Por esta razão, de acordo com o DNA *barcoding*, *Salminus* não deve ser composto por apenas quatro espécies nominais atualmente válidas. As oito MOTUs estimadas por diferentes métodos (jMOTU e GMYC) e observadas nas topologias de NJ e IB (Fig. 2), associada a informação das altas distâncias intraespecíficas em *S. brasiliensis* e *S. hilarii*, são evidências de que existem outras unidades taxonômicas dentro do gênero. Enquanto *S. affinis* e *S. franciscanus* foram aqui recuperadas como entidades moleculares bem definidas e espécies sem incoerência taxonômica, para *S. brasiliensis* e *S. hilarii*, os polimorfismos morfológicos entre bacias hidrográficas descritos em estudos prévios (Lima, 2006; Rosso et al., 2012) podem estar relacionados com as linhagens genéticas divergentes do presente estudo.

No geral, a aplicação do DNA *barcoding* sugere um novo cenário para as espécies que constituem o gênero *Salminus*. *S. affinis* e *S. franciscanus* não necessitam passar por revisões; *S. brasiliensis* deveria ser o nome utilizado para espécimes originados das bacias do Baixo rio Paraná, Paraguai e Uruguai (aqui denominados de *S. brasiliensis* 1); *S. hilarii* deveria ser usado como o nome válido dos espécimes da bacia do São Francisco (aqui nomeados de *S. hilarii* 1). Finalmente, o DNA *barcoding* suporta quatro espécies candidatas: *S. sp. Amazonas*, *S. sp. Araguaia*, *S. hilarii* 2 e *S. brasiliensis* 2. A análise utilizando o marcador RAG2 suporta apenas *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia* como potenciais novas unidades biológicas, mas não *S. hilarii* 2 e *S. brasiliensis* 2 (Fig. 4). Para essas duas últimas, nós

seremos cautelosos em definir o real status taxonômico e sugeriremos mais investigações para testar a provável presença de espécies não reconhecidas.

### **Diversidade críptica em *S. brasiliensis***

Indivíduos atualmente reconhecidos como *S. brasiliensis* têm sido reportados na literatura como *Salminus maxillosus*, *Salminus cuvieri* e *Salminus orbignyianus*, inclusive como integrante de outros gêneros (*Hydrocynus brasiliensis*, *Hydrocyon brevidens*, *Salmo 27-radiatus* e *Salmo auratus*) (Lima et al., 2003). Apesar desta complexa nomenclatura, Géry e Lauzanne (1990) sinonimizou todos os nomes e reconheceu *S. brasiliensis* como uma única unidade biológica. Entretanto, nossas análises *barcoding* revelaram duas MOTUs bem definidas dentro da espécie nominal *S. brasiliensis*, que apresentam 7.2% de divergência entre essas duas linhagens, aproximadamente sete vezes maior que o OT (1.1%).

Rosso et al. (2012), avaliando a eficiência do DNA *barcoding* para a ictiofauna da Planície dos Pampas, na Argentina, também identificou uma profunda divergência entre duas linhagens de *S. brasiliensis*. Alguns desses espécimes foram utilizadas em nossas análises (sequências FARGB na Fig. 2). Uma dessas linhagens agrupou com espécimes do Paraguai e Uruguai e formaram *S. brasiliensis* 1. A outra linhagem divergente, constituída por um único haplótipo (FARGB315), agrupou com espécimes do Alto rio Paraná e duas do rio Uruguai e formaram *S. brasiliensis* 2. Como a localização do holótipo de *S. brasiliensis* foi descrita para a região do Pantanal, bacia do rio Paraguai (Géry & Lauzanne, 1990), *S. brasiliensis* 1 representa a espécie nominal *S. brasiliensis*, enquanto *S. brasiliensis* 2, constituída por espécimes do Alto rio Paraná e 3 espécimes do rio Uruguai, necessita ser avaliada quanto aos seu status taxonômico, ou seja, se essa unidade representa uma linhagem diferente de *S. brasiliensis* ou se é uma nova espécie.

A análise com um marcador nuclear (RAG2) falhou em reconhecer os haplogrupos de *S. brasiliensis* como linhagens independentes. Devido às baixas taxas de substituição do RAG2 em relação ao COI, as relações entre *S. brasiliensis* (1 e 2) e *S. hilarii* (1 e 2) não foram esclarecidas (Fig. 4). Portanto, a parafilia de *S. brasiliensis* é suportada apenas se assumirmos que a topologia do COI reflete a verdadeira história da espécie.

Baseado na análise DNA *barcoding*, nós sugerimos uma revisão abrangente dos espécimes do Alto rio Paraná e suas relações com espécimes de *S. brasiliensis* da localidade tipo e demais regiões. Embora a amostragem do presente estudo indique que os haplogrupos estão segregados por bacias hidrográficas, estudos futuros podem encontrar múltiplas linhagens em uma mesma localidade (conforme encontrado no haplogrupo 6). Durante a construção da usina hidrelétrica de Itaipu (e conseqüente afogamento das Cataratas de Sete Queda), uma extensão de 150 Km do rio, pertencente ao Baixo rio Paraná, foi incorporada ao Alto rio Paraná. Esta ação, associada a implementação de um rio artificial (canal de piracema), que conecta o reservatório de Itaipu a porção a jusante da usina, permitindo o fluxo da fauna, potencialmente facilitou o contato entre linhagens mitocondriais isoladas desde a formação das Cataratas de Sete Quedas (Prioli et al., 2012).

### **Diversidade críptica em *S. hilarii***

Ambos marcadores (mitocondrial e nuclear) revelaram que espécimes de *S. hilarii* do Alto rio Paraná e São Francisco (localidade tipo) tem evoluído independentemente dos espécimes das bacias do Amazonas e Tocantins-Araguaia (Figs. 2, 4). Este dado corrobora prévias análises morfológicas (Lima, 2006) e moleculares (Abe et al., 2014).

A novidade das nossas análises é a descoberta de que espécimes do Amazonas e Tocantins-Araguaia são também distintos entre si, tanto com marcador mitocondrial quanto o nuclear (*S. sp.* Amazonas e *S. sp.* Araguaia, respectivamente). A média da distância genética

entre esses dois grupos foi de 8.5%, valor considerado suficiente para serem considerados distintas entidades biológicas, considerando nossas análises de DNA *barcoding*. Embora variações morfológicas nos espécimes do Amazonas e Tocantins-Araguaia tenham sido consideradas apenas em nível intraespecífico (Lima, 2006), nossa proposta, baseada nas análises moleculares de delimitação de espécie e no marcador nuclear, é que ambas MOTUs sejam elevadas ao nível de espécie.

Outro problema taxonômico que nós investigamos está relacionado aos espécimes das bacias do Alto rio Paraná e São Francisco. Shibatta & Garavello (1993), baseado em análise de componentes principais de dados morfométricos, sugeriram que ambas as bacias apresentam distintas unidades taxonômicas. DNA *barcoding* também suportou duas linhagens bem definidas, porém esta não é coincidente com as bacias hidrográficas: *S. hilarii* 1 (constituída apenas por espécimes da bacia do São Francisco) e *S. hilarii* 2 (composta por espécimes tanto do Alto rio Paraná quanto do São Francisco). A divergência inter-MOTU entre elas foi de 1.7%, valor próximo ao OT (Tabela 2).

É impossível determinar qual MOTU representa a espécie *S. hilarii*, uma vez que o holótipo é da bacia do rio São Francisco e ambas MOTUs apresentam espécimes dessa bacia (Fig. 2). Mesmo não existindo estruturação em bacias hidrográficas dessas MOTUs, nós hipotetizamos que essas linhagens poderiam ter evoluído separadamente em cada bacia e experimentaram um contato secundário, um vez que não existe compartilhamento de haplótipos entre as bacias do rio Alto Paraná e o rio São Francisco, na MOTU *S. hilarii* 2. Esse contato secundário pode ter derivado de capturas de cabeceira históricas (Buckup, 2011) ou ter sido promovido pela ação antrópica, como a transposição do sistema hidrográfico do Piumhi que corria para a bacia do Paraná e teve o seu curso mudado, passando a fazer parte da bacia do São Francisco (Moreira-Filho & Buckup, 2005). Esses eventos poderiam explicar o porquê de alguns espécimes do São Francisco agruparem com indivíduos do Alto Paraná e

também concordariam com os resultados de Shibatta e Garavello (1993). Se consideramos esta explicação, *S. hilarii* 1 seria a MOTU que representaria a espécie *S. hilarii*. De qualquer forma, uma análise morfológica detalhada, incluindo o holótipo, e estudos filogeográficos para avaliar o real status taxonômico dessas MOTUs ainda é necessário.

## Conclusões e Aplicação

O atual estudo suporta que o DNA *barcoding* (baseado em distância e em modelos, GMYC) é uma adequada ferramenta para revelar incertezas taxonômicas dentro de espécies de peixes. Esta metodologia, associada à análise com gene nuclear, mostrou a existência de, no mínimo, duas novas candidatas a espécies no gênero *Salminus*, representadas aqui como *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*. Diante dessa conclusão, o gênero passaria a ser constituído por seis espécies. *S. brasiliensis* 2 e *S. hilarii* 2 foram suportadas apenas pelo marcador mitocondrial. Para essas unidades moleculares, nós encorajamos novos estudos, utilizando outro marcador nuclear mais elucidativo para melhor definir seus status taxonômicos.

Além da taxonomia, outro impacto dos nossos resultados está na implementação de políticas conservacionistas para o gênero *Salminus*. Todas as espécies estão passando por um severo declínio populacional em consequência da pesca predatória, introdução de espécies exóticas e, principalmente, fragmentação de habitat. Apesar desse cenário alarmante, nenhuma das espécies válidas de *Salminus*, presente em território brasileiro, está incluída em listas de espécies ameaçadas internacional (IUCN, 2014) ou nacional (IBAMA, 2014). A falta de clareza na delimitação das espécies provavelmente conduziu suas ausências nessas listas.

De acordo com Rosa e Lima (2008), *S. brasiliensis* não foi incluído na lista vermelha brasileira porque algumas populações da bacia do Paraguai estão presentes na região do Pantanal, ecossistema relativamente intacto e protegido por políticas de conservação. Por esta

razão, *S. brasiliensis* não pode ser considerado uma espécie ameaçada. Entretanto, nossos dados se opõem a essa justificativa, pois esta espécie está constituída de distintos haplogrupos.

Na biologia da conservação e na aplicação de leis ambientais, o haplogrupo do Alto rio Paraná representa, pelo menos, uma unidade evolutiva significativa (UES), população pertencente a uma mesma espécie, porém diferente geneticamente de outras populações (em nosso caso, é um haplogrupo distinto do rio Paraguai), e contribui com a diversidade genética encontrada na espécie como um todo (Hey, Waples, Arnold, Butlin, & Harrison, 2003).

Em síntese, nosso estudo foi capaz de identificar uma diversidade oculta nas espécies atualmente válidas para o gênero e, pelo menos duas novas espécies aguardam descrição, totalizando seis espécies no gênero *Salminus*: *S. affinis*, *S. franciscanus*, *S. brasiliensis*, *S. hilarii*, *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*. Futuros estudos taxonômicos, integrando as informações morfológicas e moleculares são necessários para a descrição dessas novas espécies, bem como para esclarecer mais profundamente a diversidade também presente em *S. brasiliensis* e *S. hilarii*.

## **Agradecimentos**

Nós somos gratos ao Dr. Mauricio Carrillo Avila, da Universidad Surcolombiana; Dr. Hernan Ortega, do Museo de Historia Natural, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Dra. Carolina Rodrigues da Costa Doria, Laboratório de Ictiologia e Pesca, Universidade Federal de Rondônia pelas doações de tecidos e ao Dr. Flávio Lima por nos ajudar com valiosas informações taxonômicas. Um agradecimento especial ao Dr. Jorge Ramirez pela coleta em campo das amostras. Estamos em débito com a Dra. Ana Carolina Carnaval e Maria Strangas, ambas da City University of New York, pela edição do idioma e revisão do manuscrito. Esta

pesquisa foi subsidiada pelo Br-BOL (*Brazilian Barcode of Life*), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## Referências bibliográficas

- Abe, K. T., Mariguela, T. C., Avelino, G. S., Foresti, F., & Oliveira, C. (2014). Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. *BMC Evol Biol*, *14*, 152.
- Albert, J. S. & Reis, R. E. (2011). Introduction to Neotropical Freshwaters. In J. S. Albert & R. E. Reis (Eds.), *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (pp. 3-21). California: University of California Press.
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, *25*(22), 4692-4693.
- Bellafronte, E., Mariguela, T. C., Pereira, L. H. G., Oliveira, C., & Moreira-Filho, O. (2013). DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin – applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotropical Ichthyology*, *11*, 497-506.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, *360*, 1935-1943.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C-H., Xie, D., ... Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computat Biol*, *10*, e1003537.
- Brown, S. D. J., Collins, R. A., Boyer, S., Lefort, M. C., Malumbres-Olarte, J., Vink, C. J., & Cruickshank, R. H. (2012). Spider: An R package for the analysis of species identity

- and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12, 562–565.
- Buckup, P. A. (2011). The Eastern Brazilian Shield. In J. S. Albert & R. E. Reis (Eds.), *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (pp. 203-210). California: University of California Press.
- Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A., & de Mattia, F. (2010). DNA barcoding: A six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*. . doi: 10.1093/bib/bbq003
- Collins, R. A., Boykin, L. M., Cruickshank, R. H., & Armstrong, K. F. (2012). Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 457-465.
- Costa-Silva, G. J., Rodriguez, M. S., Roxo, F. F., Foresti, F., & Oliveira, C. (2015). Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex Neotropical hyperdiverse group. *PLoS ONE*, 10, e0135075.
- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (2004). *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 407-415.
- de Carvalho, D. C., Oliveira, D. A. A., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C., & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishers: the case of the São Francisco River Basin. *Mitochondrial DNA*, 22, 80-86.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- Galimberti, A., Spada, M., Russo, D., Mucedda, M., Agnelli, P., Crottini, A., ... Casiraghi, M. (2012). Integrated Operational Taxonomic Units (IOTUs) in Echolocating Bats: A bridge between Molecular and Traditional Taxonomy. *PLoS ONE*, 7, e40122.

- Géry, J., & Lauzanne, L. (1990). Les types des espèces du genre *Salminus* Agassiz, 1829 (Ostariophysi, Characidae) du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris. *Cybium*, *14*, 113-124.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *270*, 313-321.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol*, *2*, e312.
- Hey, J., Waples, R. S., Arnold, M. L., Butlin, R. K., & Harrison, R. G. (2003). Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, *18*, 597-603.
- IBAMA. (2014). *Lista de espécies ameaçadas*. Retrieved from <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html> (Accessed 28 August 2015).
- IUCN. (2014). *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3*. Retrieved from <http://www.iucnredlist.org> (Accessed 28 August 2015).
- Janzen, D. H., Hallwachs, W., Blandin, P., Burns, J. M., Cadiou, J., Chacon, I., ... Wilson, J. J. (2009). Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources*, *9*, 1–26. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02628.x
- Jones, M., Ghoorah, A., & Blaxter, M. (2011). JMOTU and Taxonerator: turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. *PLoS ONE*, *6*(4): e19259.

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647-1649.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Kusukawa, N., Uemori, T., Asada, K. & Kato, I. (1990). Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 9, 66-72.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y., & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1695–1701.
- Lima, F. C. T. (2006). *Revisão taxonômica e relações filogenéticas do gênero Salminus (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae)*. (Unpublished doctoral dissertation). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Lima, F. C. T., & Britski, H. A. (2007). *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 5, 237-244.
- Lima, F. C. T., Malabarba, L. R., Buckup, P. A., Pezzi Da Silva, J. F., Vari, R. P., Harold, A., ... Lucinda, P. H. F. (2003). Genera Incertae Sedis in Characidae. In R. E. Reis, S. O. Kullander, & C. J. Ferraris Jr (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (pp. 106-169). Porto Alegre: Edipucrs.
- Martin, D., & Rybicki, E. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16, 562-563.

- Meyer, C., & Paulay, P. (2005). DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, *3*, e422. doi:10.1371/journal.pbio.0030422
- Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J. G., ... Vogler, A. P. (2009). Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology*, *58*, 298–311.
- Moreira-Filho, O., & Buckup, P. A. (2005). A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. *Neotropical Ichthyology*, *3*, 449-452.
- Nagy, Z. T., Sonet, G., Glaw, F., & Vences, M. (2012). First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. *PLoS ONE*, *7*, e34506.
- Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguela, T. C., Benine, R. C., Ortí, G., ... Corrêa e Castro, R. M. C. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose Family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evol Biol*, *11*, 275.
- Ortí, G., & Meyer, A. (1997). The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*. doi: 10.1093/sysbio/syp027
- Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genet*, *14*, 20.
- Pereira, L. H. G., Maia, G. M. G., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, *22* 71-79.

- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253- 1256.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., ... Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55, 595–609.
- Prioli, A. J., Carlo, V. A., Soria, T. V., Prioli, S. M. A. P., Pavanelli, C. S., Prioli, R. A., ... Prioli, L. M. (2012). Mitochondrial D-loop nucleotide diversity in *Astyanax* (Osteichthyes, Characidae) from the upper Paraná and upper Paraguay River basins. *Genetics and Molecular Research*, 11, 1064-1074.
- Rambaut, A., & Drummond, A.J. (2007). Tracer v1.4. Available: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Reis, R. E., Kullander, S. O., & Ferraris, C. J. (2003). *Checklist of freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs.
- Rosa, R. S., & Lima, F. T. (2008). Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. In A. B. M. Machado, G. M. Drummond, & A. P. Paglia (Eds.), *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção* (pp. 9-285). MMA, Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas.
- Rosso, J. J., Mabragaña, E., González Castro, M., & Díaz de Astarloa, J. M. (2012). DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology Resources*, 12, 999-1011.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Shibatta, O. A., & Garavello, J. C. (1993). Estudo da variação geográfica em *Salminus hilarii* Valenciennes, 1849, das Bacias do Alto Paraná e São Francisco, através da

- análise morfométrica multivariada em componentes principais. *Naturalia*, 18, 109-116.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, Filipiski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L., & Wang, Y. (2003). An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26, 1-7.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. T., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 360, 1847-1857.

## TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Área de distribuição e locais de coleta de *Salminus* na América do Sul.

Espécie/ Espécimes	Localidade	Bacia Hidrográfica	Coordenadas Geográficas
<i>Salminus affinis</i> (SA)			
SA_005 <sup>1</sup>	Rio Magdalena, Neiva, Colômbia	Magdalena	2°59'32.87'' N 75°16'22.78'' W
SA_009 <sup>1</sup>	Rio Magdalena, Neiva, Colômbia	Magdalena	2°59'32.87'' N 75°16'22.78'' W
SA_019	Rio Magdalena, Neiva, Colômbia	Magdalena	2°59'32.87'' N 75°16'22.78'' W
SA_020	Rio Magdalena, Neiva, Colômbia	Magdalena	2°59'32.87'' N 75°16'22.78'' W
SA_021	Rio Magdalena, Neiva, Colômbia	Magdalena	2°59'32.87'' N 75°16'22.78'' W
<i>Salminus brasiliensis</i> (SB)			
SB_571* <sup>1</sup>	Rio Sepotuba, Mato Grosso, Brasil	Paraguai	14°48'28.13'' S 57°46'45'' W
SB_174	Riu Jaurú, Mato Grosso, Brasil	Paraguai	16°19'48.41'' S 57°47'58.19'' W
SB_187	Rio Sepotuba, Mato Grosso, Brasil	Paraguai	15°52'41.74'' S 57°38'34.28'' W
SB_194	Rio Paraguai, Mato Grosso, Brasil	Paraguai	15°5'17.87'' S 57°11'51.36'' W
SB_199 <sup>1</sup>	Rio Paraguai, Mato Grosso, Brasil	Paraguai	15°5'17.87'' S 57°11'51.36'' W
SB_252	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°55'33.6'' S 47°21'12'' W
SB_263	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°55'37.8'' S 47°21'59.2'' W
SB_264	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°55'37.8'' S 47°21'59.2'' W
SB_284	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°55'31.4'' S 47°21'59.4'' W
SB_294	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°55'31.4'' S 47°21'59.4'' W
SB_268	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°55'37.8'' S 47°21'59.2'' W
SB_302	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°55'31.4'' S 47°21'59.4'' W
SB_309	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°55'31.4'' S 47°21'59.4'' W
SB_356	Rio Turvo, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°25'24'' S 49°15'16.6'' W
SB_373*	Rio Turvo, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°25'24'' S 49°15'16.6'' W
SB_355	Rio Turvo, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°10'28.3'' S 49°38'13.1'' W
SB_373*	Rio Turvo, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°25'24'' S 49°15'16.6'' W
SB_439	Rio Turvo, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°22'39.2'' S 49°16'38.8'' W
SB_378	Rio Tietê, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°30'49.62'' S 48°32'27.45'' W
SB_437* <sup>1</sup>	Rio Tietê, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°29'57.54'' S 48°33'40.74'' W
SB_396	Rio Jacaré-pepira, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°4'30.15'' S 48°28'48.34'' W

SB_426	Rio Paranapanema, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°56'26'' S 50°31'2'' W
SB_427	Rio Paranapanema, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°56'26'' S 50°31'2'' W
SB_436	Rio Paranapanema, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°56'26'' S 50°31'2'' W
SB_455	Rio Paranapanema, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°56'26'' S 50°31'2'' W
SB_458	Rio Paranapanema, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°56'26'' S 50°31'2'' W
SB_480	Rio Paranapanema, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°56'26'' S 50°31'2'' W
SB_498*	Rio Paraná, Paraná, Brasil	Alto rio Paraná	23°22'11.13'' S 53°45'52.40'' W
SB_517	Rio Paraná, Paraná, Brasil	Alto rio Paraná	23°22'11.13'' S 53°45'52.40'' W
SB_537	Rio Paraná, Paraná, Brasil	Alto rio Paraná	23°22'11.13'' S 53°45'52.40'' W
SB_552	Rio Paraná, Paraná, Brasil	Alto rio Paraná	23°22'11.13'' S 53°45'52.40'' W
SB_577* <sup>1</sup>	Rio Piracicaba, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°43'24.38'' S 47°39'27.37'' W
SB_P2	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_P3	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_P67	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_P68	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_P69	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_P70	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_Y1	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_Y2 <sup>1</sup>	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_Y3	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_Y4	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_Y7	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_T125	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_L08	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_L10	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_L27	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_L40	Rio Uruguai, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	27°10'15.30'' S 53°50'10.18'' W
SB_326	Rio Caí, Rio Grande do Sul, Brasil	Lagoa dos Patos	29°39'42.55'' S 51°24'55.91'' W
SB_339 <sup>1</sup>	Rio Ibicuí da Armada, Rio Grande do Sul, Brasil	Uruguai	30°16'58.37'' S 54°54'24.53'' W

*Salminus franciscanus* (SF)

SF_005	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	18°20'15.69" S 45°17'1.12" W
SF_007	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	18°20'15.69" S 45°17'1.12" W
SF_016 <sup>1</sup>	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	18°20'15.69" S 45°17'1.12" W
SF_027	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	18°20'15.69" S 45°17'1.12" W
SF_035* <sup>1</sup>	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	17°20'22" S 44°57'20.87" W
SF_036*	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	17°20'22" S 44°57'20.87" W
SF_104	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	17°8'52.48" S 45°51'36.67" W
SF_116	Rio Corrente, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	13°17'50.39" S 43°54'25.82" W

*Salminus hilarii* (SH e SI)

SH_002 <sup>1</sup>	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°20'54.06" S 46°4'6.39" W
SH_003 <sup>1</sup>	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°20'54.06" S 46°4'6.39" W
SH_004	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°20'54.06" S 46°4'6.39" W
SH_007	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°20'54.06" S 46°4'6.39" W
SH_008 <sup>1</sup>	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°20'54.06" S 46°4'6.39" W
SH_045	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°12'10.5" S 45°52'25.7" W
SH_160* <sup>1</sup>	Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°12'10.5" S 45°52'25.7" W
SH_009 <sup>1</sup>	Rio Peixe, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°11'57.65" S 46°14'57.22" W
SH_022	Rio do Peixe, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°11'57.65" S 46°14'57.22" W
SH_025	Rio Peixe, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°11'57.65" S 46°14'57.22" W
SH_026	Rio Peixe, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°11'57.65" S 46°14'57.22" W
SH_010	Rio Samburá, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°10'6.60" S 46°15'4.92" W
SH_018	Rio Samburá, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°10'6.60" S 46°15'4.92" W
SH_035	Rio Samburá, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°5'4.3" S 46°15'5.68" W
SH_042	Rio Samburá, Minas Gerais, Brasil	São Francisco	20°5'4.3" S 46°15'5.68" W
SH_061	Rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°5'18.78" S 48°10'57.54" W
SH_070	Rio Cachoerinha, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°36'15.4" S 49°07'44.8" W
SH_074* <sup>1</sup>	Rio Ponte Nova, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°15'25.8" S 47°47'43.8" W
SH_076*	Rio Ponte Nova, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°15'25.8" S 47°47'43.8" W
SH_078*	Rio Ponte Nova, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°15'25.8" S 47°47'43.8" W

SH_068	Rio Turvo, São Paulo, Brasil	Alto Paraná	20°22'39.2'' S 49°16'38.8'' W
SH_069	Rio Turvo, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°22'39.2'' S 49°16'38.8'' W
SH_079*	Rio Turvo, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	20°10'50.4'' S 49°38'02.0'' W
SH_082	Rio Turvo, São Paulo Brasil	Alto rio Paraná	20°25'6.89'' S 49°16'1.6'' W
SH_088	Rio Cubatão, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°1'55.65'' S 49°23'8.12'' W
SH_091	Rio Cubatão, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	21°1'55.65'' S 49°23'8.12'' W
SH_095	Rio Jacaré Pepira, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°15'54.13'' S 48°13'44.85'' W
SH_100	Rio Jacaré Pepira, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°15'54.13'' S 48°13'44.85'' W
SH_105	Rio Batalha, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°2'40'' S 49°14'57'' W
SH_118 <sup>1</sup>	Rio Batalha, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	22°2'40'' S 49°14'57'' W
SH_104	Rio Quebra-Anzol, São Paulo, Brasil	Alto rio Paraná	19°25'39.4'' S 46°35'06;9'' W
SH_151	Rio do Carmo, São Paulo Brasil	Alto rio Paraná	20°9'52.87'' S 47°52'42.99'' W
SI_002* <sup>1</sup>	Rio Araguaia, Mato Grosso, Brasil	Tocantins-Araguaia	15°53'1.27'' S 52°6'24.14'' W
SI_005*	Rio Araguaia, Mato Grosso, Brasil	Tocantins-Araguaia	15°53'1.27'' S 52°6'24.14'' W
SI_010* <sup>1</sup>	Rio Araguaia, Mato Grosso, Brasil	Tocantins-Araguaia	15°53'1.27'' S 52°6'24.14'' W
SI_012*	Rio Araguaia, Mato Grosso, Brasil	Tocantins-Araguaia	15°53'1.27'' S 52°6'24.14'' W
SI_014*	Rio Araguaia, Mato Grosso, Brasil	Tocantins-Araguaia	15°53'1.27'' S 52°6'24.14'' W
SI_015* <sup>1</sup>	Rio Madeira, Rondônia, Brasil	Amazonas	8°48'11.22'' S 63°57'42.20'' W
SI_016*	Rio Madeira, Rondônia, Brasil	Amazonas	9°1'16.20'' S 64°11'21.76'' W
SI_017* <sup>1</sup>	Rio Madeira, Rondônia, Brasil	Amazonas	9°15'7.84'' S 64°38'4.61'' W
SI_018	Rio Orteguaza, Caquetá, Colômbia	Amazonas	1°32'22.65'' N 75°31'45.76'' W
SI_019	Rio Orteguaza, Caquetá, Colômbia	Amazonas	1°32'22.65'' N 75°31'45.76'' W
SI_020 <sup>1</sup>	Rio Orteguaza, Caquetá, Colômbia	Amazonas	1°32'22.65'' N 75°31'45.76'' W
SI_022	Rio Orteguaza, Caquetá, Colômbia	Amazonas	1°32'22.65'' N 75°31'45.76'' W
SI_023	Rio Orteguaza, Caquetá, Colômbia	Amazonas	1°32'22.65'' N 75°31'45.76'' W
SI_024* <sup>1</sup>	Rio Amazonas, Iquitos, Peru	Amazonas	3°45'54'' S 73°14'45'' W
SI_025*	Rio Amazonas, Iquitos, Peru	Amazonas	3°45'54'' S 73°14'45'' W
SI_026* <sup>1</sup>	Rio Amazonas, Iquitos, Peru	Amazonas	3°45'54'' S 73°14'45'' W
<i>Brycon</i> sp.			
B_15* <sup>1</sup>	Rio Sepotuba, Mato Grosso, Brasil	Paraguai	14°36'32.8'' S 57°44'4.6'' W

B\_16\*

Rio Sepotuba, Mato Grosso, Brasil

Paraguai

14°36'32.8'' S 57°44'4.6'' W

\*Vouchers; <sup>1</sup>Espécimes também utilizados para análise com o RAG2.

Tabela 2. Média das distâncias genéticas, através do modelo de K2P, entre as oito MOTUs de *Salminus*. Em negrito, na diagonal, são os valores médios das distâncias intra-MOTU.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>S. affinis</i>	<b>0.000</b>							
2. <i>S. brasiliensis</i> 1	0.092	<b>0.001</b>						
3. <i>S. brasiliensis</i> 2	0.091	0.072	<b>0.003</b>					
4. <i>S. franciscanus</i>	0.098	0.087	0.053	<b>0.001</b>				
5. <i>S. hilarii</i> 1	0.091	0.063	0.026	0.061	<b>0.002</b>			
6. <i>S. hilarii</i> 2	0.093	0.065	0.021	0.058	0.017	<b>0.004</b>		
7. <i>S. sp.</i> Araguaia	0.122	0.123	0.107	0.110	0.106	0.107	<b>0.000</b>	
8. <i>S. sp.</i> Amazonas	0.086	0.099	0.103	0.110	0.094	0.096	0.085	<b>0.003</b>

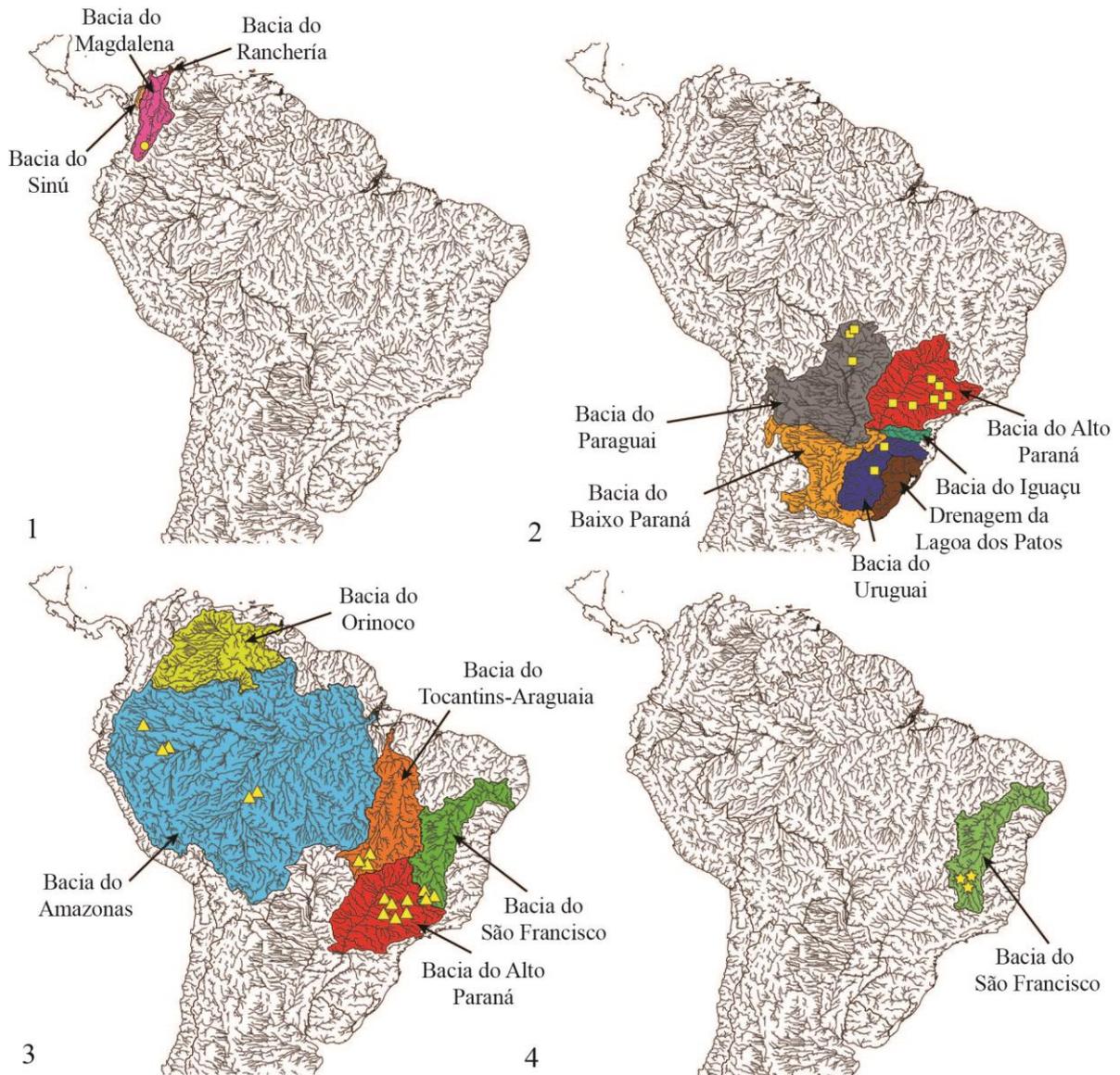
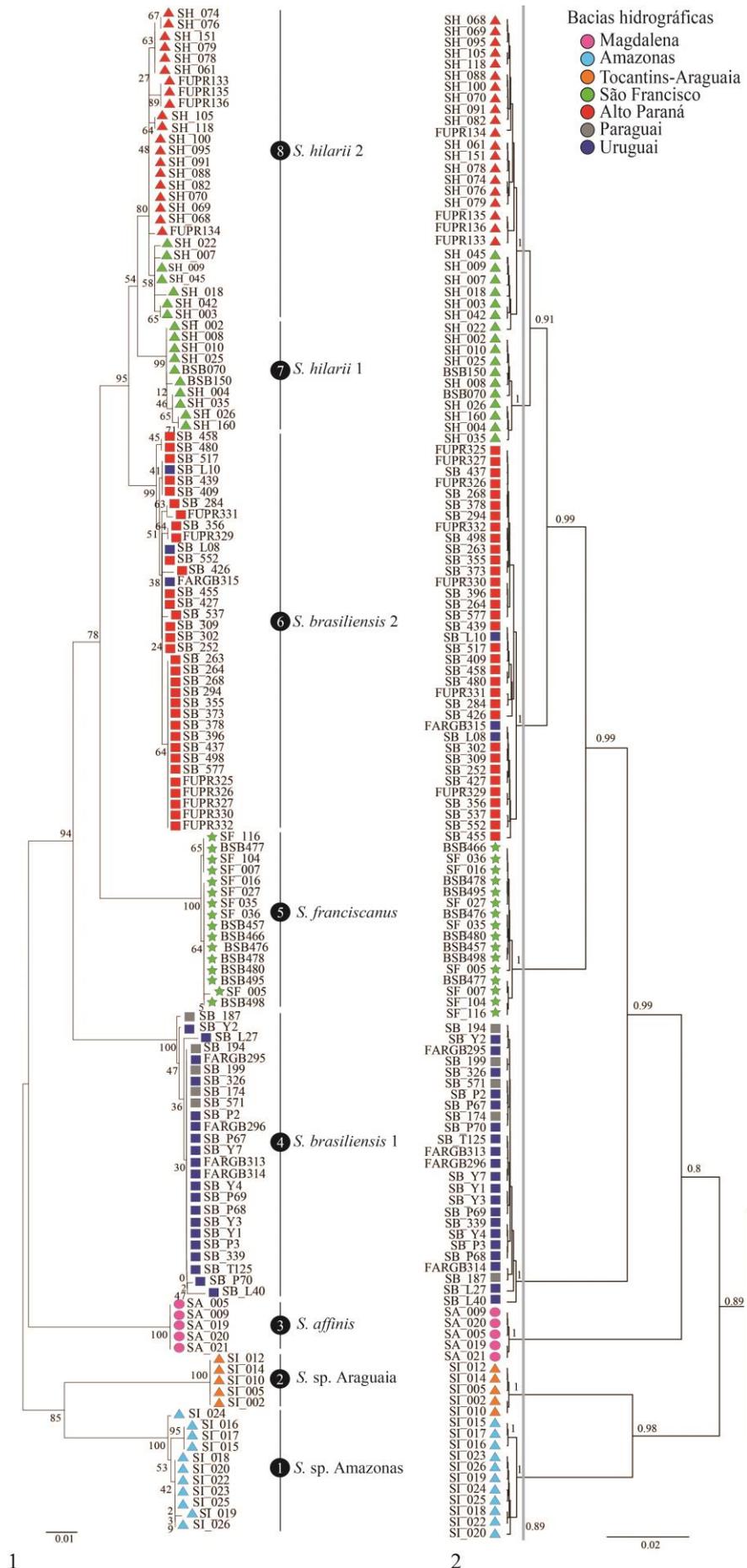


Fig.1. Bacias hidrográficas onde ocorrem as espécies de *Salminus* e os locais de coleta (símbolos amarelos): (1.1) *Salminus affinis*, círculos; (1.2) *Salminus brasiliensis*, quadrados; (1.3) *Salminus hilarii*, triângulos; e (1.4) *Salminus franciscanus*, estrelas.



1

2

Fig. 2. Topologias derivadas de duas abordagens de delimitações de espécies baseadas em 136 sequências COI de *Salminus*. (2.1) DNA *barcoding* tradicional: topologia de NJ com valores de *bootstrap* localizados acima dos ramos. (2.2) Topologia de IB com probabilidades posteriores. A barra vertical cinza indica o único ponto de transição entre os processos de especiação/extinção e coalescência, com máximo valor de verossimilhança. Apenas probabilidade maiores que 80% foram representadas. Ambas topologias foram construídas com sequências do banco de dados da BOLD (espécimes FUPR, BSB e FARGB) e as sequências produzidas neste trabalho; Símbolos representam as quatro espécies nominais: *S. affinis* (círculo), *S. brasiliensis* (quadrado), *S. franciscanus* (estrela) e *S. hilarii* (triângulo).

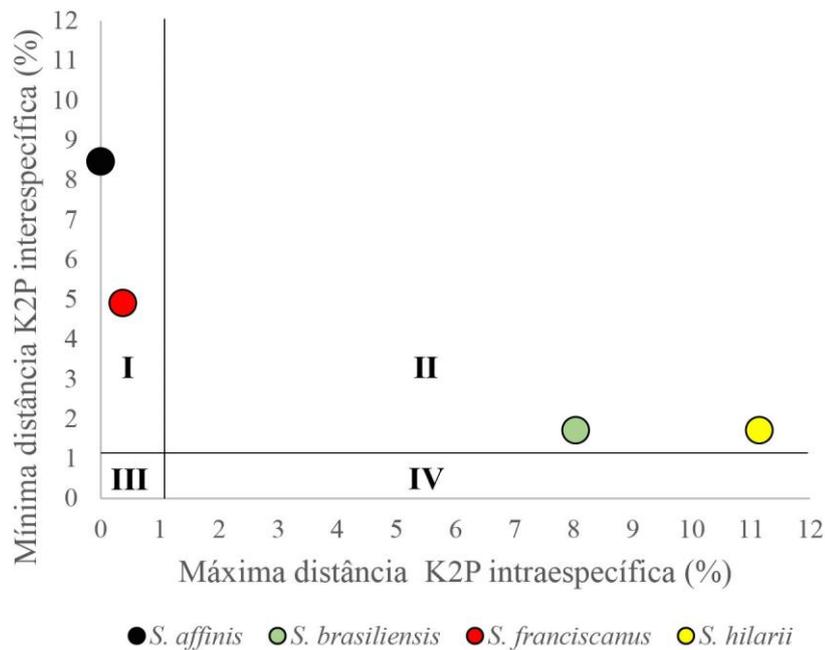


Fig. 3. Comparação entre a distância COI intra e interespecífica utilizando as quatro espécies de *Salminus* atualmente válidas. Os quatro quadrantes indicados representam: (I) concordância entre a taxonomia atual e identificação molecular; (II) possível existência de espécies crípticas; (III) recente divergência, sinonímia ou hibridização; e, (VI) nenhuma correspondência entre taxonomia e identificação molecular.



## MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 – Informação sobre os números de acesso\* das sequências COI e RAG2.

Espécies/ Espécimes	Número de acesso COI (BOLD)	Número de acesso RAG2 (GenBank)
<i>Salminus affinis</i> (SA)		
SA_005	PBS041-15	KT619160
SA_009	PBS042-15	KP342002
SA_021	PBS015-15	-
<i>Salminus brasiliensis</i> (SB)		
SB_199	PBS016-15	KP342003
SB_252	PBS017-15	-
SB_339	PBS018-15	KP342004
SB_373	PBS012-14	-
SB_437	PBS013-14	KP342005
SB_571	PBS019-15	KP342006
SB_577	PBS020-15	KP342007
SB_Y2	PBS021-15	KP342008
<i>Salminus franciscanus</i> (SF)		
SF_005	PBS022-15	-
SF_016	PBS023-15	KP342009
SF_035	PBS001-14	KP342010
SF_036	PBS002-14	-
<i>Salminus hilarii</i> (SH)		
SH_002	PBS024-15	KP342011
SH_003	PBS025-15	KP342012
SH_008	PBS026-15	KP342013

SH_009	PBS027-15	KT619161
SH_010	PBS028-15	-
SH_018	PBS029-15	-
SH_025	PBS025-15	-
SH_068	PBS031-15	-
SH_074	PBS010-14	KP342014
SH_078	PBS011-14	-
SH_079	PBS032-15	-
SH_088	PBS033-15	-
SH_118	PBS034-15	KP342015
SH_160	PBS035-15	KT619162
<i>Salminus</i> sp. Araguaia (SI)		
SI_002	PBS003-14	KP342016
SI_010	PBS005-14	KP342017
SI_014	PBS007-14	-
<i>Salminus</i> sp. Amazonas (SI)		
SI_015	PBS008-14	KP342018
SI_016	PBS043-15	-
SI_017	PBS009-14	KP342019
SI_019	PBS036-15	-
SI_020	PBS037-15	KP342020
SI_024	PBS038-15	KP342021
SI_026	PBS039-15	KP342022
<i>Brycon</i> sp.		
B_15	PBS040-15	KP342001

\* As seqüências apresentadas nessa tabela foram publicadas na revista *Systematics and Biodiversity*.

Tabela S2: Média e máxima distância intraespecífica das espécies de *Salminus*, baseadas em K2P.

Espécies	Média intraespecífica	Máxima intraespecífica
<i>S. affinis</i>	0.000	0.000
<i>S. brasiliensis</i>	0.036	0.080
<i>S. franciscanus</i>	0.001	0.004
<i>S. hilarii</i>	0.050	0.111

Tabela S3: Modelos de evolução nucleotídica para cada partição por posição do códon determinados com Partition Finder 1.1.1, usando critério de informação bayesiana.

Gene	Modelos de evolução nucleotídica	Bases
COI primeira base do códon	TrNef	1-647/3
COI segunda base do códon	HKY	2-647/3
COI terceira base do códon	K80+G	3-647/3
RAG2 primeira base do códon	K80	1-926/3
RAG2 segunda base do códon	K80	2-926/3
RAG2 terceira base do códon	K80	3-926/3

**Capítulo 2**

Testando cenários biogeográficos: Abordagem bayesiana  
revela história evolutiva de peixes Neotropicais

(A ser submetido para: *Journal of Biogeography*)



Testando cenários biogeográficos: Abordagem bayesiana revela história evolutiva de peixes Neotropicais

Carolina de Barros Machado da Silva<sup>1\*</sup>, Ana Carolina Carnaval<sup>2</sup> e Pedro Manoel Galetti Jr<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 13565-905, Brasil.

<sup>2</sup> Department of Biology, City College of New York, 160 Convent Avenue, New York, NY 10031, USA

\*Correspondência: Carolina de Barros Machado da Silva, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235 - SP-310, São Carlos, SP, 13565-905, Brasil.

E-mail: carolbioms@gmail.com

Título curto: Testando hipóteses de diversificação em peixes Neotropicais

Número de palavras: 6990 (Texto em inglês)

## RESUMO

**Objetivos:** Entre as principais hipóteses biogeográficas que explicam a notável diversidade da ictiofauna neotropical destacam-se a paleogeográfica e a hidrogeológica. Apesar de refletirem processos diferentes podem resultar em um mesmo padrão. Com isso o objetivo do trabalho é utilizar abordagem bayesiana baseada em modelos para testar hipóteses alternativas e distinguir entre as assinaturas filogeográficas de vicariância e geodispersão na história evolutiva de peixes sul-americanos.

**Localização:** América do Sul.

**Métodos:** Nós empregamos marcadores moleculares para reconstruir a filogenia e estimar os tempos de divergência entre as espécies do gênero *Salminus*, associando os resultados com os eventos geoclimáticos conhecidos. Posteriormente, empregamos a computação bayesiana aproximada (ABC) para distinguir entre as assinaturas filogeográficas dos eventos. A principal diferença entre vicariância e geodispersão é que esta última apresentará uma assinatura de efeito fundador.

**Resultados:** A filogenia revelou que *Salminus affinis*, única com distribuição transandina, é a espécie-irmã de dois grandes grupos: Noroeste, formado por *Salminus* sp. Amazonas e *Salminus* sp. Araguaia, e Sudeste, constituído por *Salminus brasiliensis*, *Salminus franciscanus* e *Salminus hilarii*. O processo de diversificação entre as espécies se iniciou no Mioceno Superior e está associada a eventos de vicariância e geodispersão a que modelaram a paisagem hidrogeológica. A reconstrução de cenários, através da abordagem ABC, distinguiu que o evento de vicariância foi o responsável pela estrutura filogeográfica de *S. brasiliensis* e pela separação de *S. sp. Araguaia* e *S. sp. Amazonas*. Por outro lado, geodispersão foi o evento mais importante para a estruturação das linhagens de *S. hilarii*.

**Principais conclusões:** Nós evidenciamos que as assinaturas filogeográficas de vicariância e geodispersão puderam ser detectadas em nosso modelo biológico. A correspondência entre os

resultados da análise ABC e da filogeografia tradicional sugerem confiança e robustez nos modelos desenhados e testados. A aplicabilidade do método ABC deve ser considerada em futuros estudos filogeográficos, uma vez que a análise foi capaz de testar hipóteses alternativas sobre a história demográfica das espécies, com base nas mudanças de tamanho populacional e diversificação populacional ao longo do tempo evolutivo.

Palavras chaves: Análise ABC, América do Sul, diversificação evolutiva, geodispersão, *Salminus*, vicariância.

## INTRODUÇÃO

A análise e a compreensão sobre quais processos ecológicos e/ou geológicos foram responsáveis pela origem e organização da notável biodiversidade Neotropical tem sido alvo de uma quantidade considerável de estudos filogeográficos (Hubert et al., 2006; Weir, 2006; Antonelli & Sanmartín, 2011; Rull, 2011; Castroviejo-Fisher et al., 2013). Para explicar a diversidade de organismos e os complexos processos de diversificação na região Neotropical, várias hipóteses foram propostas (ver detalhes em Leite & Rogers, 2013). No entanto, muitos estudos filogeográficos estão direcionados a organismos terrestres e a questões sobre como os biomas sul-americanos evoluíram. Espécies de água doce, através de sua associação direta com as bacias hidrográficas, oferecem uma oportunidade única para estudar a dinâmica da paisagem hidrológica neotropical e sobre como processos geomorfológicos a moldaram (Sivasundar et al., 2001; Montoya-Burgos, 2003; Hubert & Renno, 2006; Hubert et al., 2007; Tagliacollo et al., 2015; Thomaz et al., 2015). Usando dados *multiloci* para espécies de *Salminus*, nós nos perguntamos como os eventos de vicariância e geodispersão impactaram a diferenciação das linhagens em sistemas aquáticos.

Embora os principais sistemas aquáticos da América do Sul tenham começado seu desenvolvimento após a quebra da Gondwana ( $\cong 90$  *megaanum* – Ma), muitos deles atingiram a sua moderna configuração depois de terem sido fortemente influenciados pelo processo de soergimento do norte dos Andes, ocorrido no Mioceno (12 – 10 Ma) (Hubert et al., 2007). Através da compressão tectônica, a orogênese dos Andes promoveu vários eventos de coalescência e ruptura de sistemas hidrográficos adjacentes (Lundberg et al., 1998; Hoorn et al., 2010), enquanto flutuações no nível do mar e mudanças climáticas impactaram também a conexão dos rios, porém durante o Plio-Pleistoceno (Albert et al., 2011).

Baseados nessas transformações da paisagem hidrológica, duas principais hipóteses têm sido empregadas para explicar sobre os processos alopátricos responsáveis pela diversificação de espécies dulcícolas neotropicais. A *hipótese paleogeográfica* tem focado no surgimento de barreiras impermeáveis, particularmente resultadas de rearranjos tectônicos, como um dos principais promotores de diversificação; estudos de paleoarcos da bacia Amazônica (Albert et al., 2006) são um dos exemplos. A *hipótese hidrogeológica* tem enfatizado capturas de cabeceiras entre bacias como um importante evento desencadeador de colonização de novas áreas com subsequente diferenciação (Montoya-Burgos, 2003; Hubert & Renno, 2006). Este cenário implica na remoção temporária da barreira entre bacias adjacentes, permitindo a mistura de assembleias locais, fluxo gênico e expansão de área – um processo denominado de geodispersão (Ho et al., 2015; Tagliacollo et al. 2015).

Embora ambos processos resultem em diferentes padrões biogeográficos, identificar se espécies-irmãs alopátricas divergiram por vicariância ou geodispersão pode ser uma tarefa desafiadora, particularmente quando novas barreiras emergem após capturas de cabeceira, ou em face de extinções locais (Burrige et al., 2006; Kodandaramaiah, 2010). Com base em recentes avanços nos métodos de genética de populações que testam hipóteses demográficas alternativas com base em dados *multiloci*, nós empregamos a abordagem de computação bayesiana aproximada (ABC<sup>5</sup>, em inglês, *Approximate Bayesian Computation*; Beaumont et al., 2002; Beaumont 2010; Bertorelle et al., 2010) para distinguir entre as assinaturas filogeográficas de vicariância (hipótese paleogeográfica) vs. geodispersão (hipótese hidrogeológica) na história evolutiva de peixes sul-americanos do gênero *Salminus*. A monofilia do grupo (Abe et al., 2014), a grande capacidade migratória de suas espécies (Lima

---

<sup>5</sup> A análise é baseada em uma classe de algoritmos que utiliza cadeia de Monte Carlos para fazer inferências baseadas em modelos (cenários). O método ABC ignora cálculos de verossimilhança, comuns em testes de hipóteses alternativas (Tagliacollo et al., 2015), passando a utilizar estatísticas sumárias e um volume grande de simulações. Essa mudança permite os usuários utilizarem muitos dados (microssatélites, SNPs e sequências) em cenários demográficos complexos para determinar qual história é mais provável (maior probabilidade posterior) para o organismo em questão (Cornuet et al., 2010).

& Britski, 2007) e sua disjunta distribuição ao longo das grandes bacias hidrográficas tornam o gênero um modelo biológico ideal para esclarecer o papel dos processos paleogeográficos e hidrogeológicos na diversificação dos peixes sul-americanos e questionar como as mudanças na paisagem local podem ter impactado na biota fluvial local.

Para compreender como as mudanças da antiga paisagem impactaram o padrão de distribuição da diversidade de linhagens nas espécies de *Salminus*, nós utilizamos dois marcadores mitocondriais e dois nucleares para reconstruir as relações filogenéticas dentro do gênero, incluindo amostras de todas as unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTUs) definidas por Machado et al. (no prelo). Conforme outros estudos filogeográficos de sistemas aquáticos de água doce sul-americanos (Tagliacollo et al., 2015; Willis et al., 2015), nós usamos nossa árvore de espécies para estimar os tempos de divergência entre e dentro das espécies e associamos os resultados com os eventos geológicos conhecidos, assim sinalizando quais processos foram relevantes para a diversificação do grupo.

Indo além de um estudo de associação, nós empregamos a abordagem estatística ABC para especificamente identificar qual cenário biogeográfico (paleogeográfico ou hidrogeológico) melhor explica a estrutura filogeográfica das linhagens de *Salminus brasiliensis* e *Salminus hilarii*, e o processo de divergência entre *Salminus* sp. Amazonas e *Salminus* sp. Araguaia. Nós esperamos que eventos de diversificação desencadeados por colonização, ou seja, aqueles facilitados por eventos de captura de cabeceiras (hipótese hidrogeológica), deixem como assinatura genética um efeito fundador em áreas colonizadas (Costello et al., 2003), uma vez que *Salminus* é encontrado na calha principal e um número reduzido de espécimes serão capturados. Por outro lado, diversificação causada por vicariância, conforme a hipótese paleogeográfica, não é esperada encontrar o efeito fundador (Fig. 1). Para verificar qual assinatura prevalece dentro das espécies de *Salminus*, nós simulamos cenários alternativos considerando mudanças no tamanho populacional ao longo

do tempo concomitantemente com a divergência das linhagens, e os comparamos com os nossos dados empíricos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem de dados moleculares

Nós amostramos 94 espécimes de *Salminus*, incluindo representantes de quatro espécies nominais (*Salminus affinis*, *S. brasiliensis*, *Salminus franciscanus* e *S. hilarii*) e duas novas potenciais espécies (*S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*), identificadas em Machado et al. (no prelo) (Fig. 2, Tabela S1 na Informação de suporte).

Sequências parciais de três regiões mitocondriais, Citocromo C Oxidase I (COI), Citocromo B (Cytb) e D-loop, e dois marcadores nucleares, o *recombination activating gene* (RAG2) e o íntron do gene ribossomal S7 (S7), foram amplificadas com *primers* descritos no Tabela S2. Condições das reações da cadeia de polimerase (PCR), purificações dos produtos de PCR e sequenciamento foram realizados conforme descrito por Machado et al. (no prelo). Todas as sequências mitocondriais e nucleares estão disponíveis no GenBank (ver Tabela S1 para os números de acesso).

As sequências foram alinhadas e editadas no GENEIOUS R7 v6.1.6 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012). Devido à presença de indivíduos heterozigotos para inserções e/ou deleções em sequências do marcador S7 em *S. brasiliensis*, *S. hilarii* e *S. sp. Amazonas*, resultando em eletroferogramas com picos sobrepostos, nós também utilizamos o CodonCode Aligner v.4.2.7 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). O *software* CodonCode Aligner é indicado para encontrar e processar os indivíduos heterozigotos, pois emprega dois diferentes algoritmos que extraem as sequências apropriadas para análise molecular. O processo é simples: fornecemos uma sequência referência (essa

sequência é escolhida a partir de indivíduos homocigotos) e a partir dos eletroferogramas com sobreposição de picos, os algoritmos criam “pseudosequências”. O indivíduo heterocigoto, portanto, apresentará duas sequências que o representará. No Geneious, nós utilizamos a ferramenta “Achar heterocigotos”, para todas as sequências nucleares com um limiar de 80%, com o objetivo de identificar posições ambíguas e assinalar códigos para bases degeneradas. Feito isso, prosseguimos com a reconstrução dos haplótipos com auxílio do programa PHASE 2.1 (Stephens & Donnelly, 2003) e o aplicativo online SeqPhase (Flot, 2010).

### **Inferência filogenética**

Antes de conduzir as análises filogenéticas, nós checamos a possibilidade da existência de recombinação para os marcadores RAG2 e S7 com o RDP3.44 (Martin & Rybicki, 2000). Também avaliamos a saturação das substituições para cada marcador através do Índice de Saturação de Substituição ( $I_{ss}$ ), baseado em entropia, estimado no DAMBE (Xia, Xie, Salemi, Chen, & Wang, 2003). Modelos de substituição nucleotídica foram determinados com o JModeltest 2.1.4 (Posada, 2008) utilizando o critério de informação bayesiana (BIC) (Lanfear et al., 2012).

Para inferência filogenética, nós empregamos o método baseado em coalescência de árvore de espécies (\*BEAST) implementado no pacote BEAST 1.8 (Drummond et al., 2012). Espécimes do gênero *Brycon* foram utilizados para enraizar a árvore, seguindo Ortí & Meyer (1997). Devido à alta saturação, o D-loop foi excluído das nossas análises filogenéticas; a árvore de espécies foi então inferida com três *loci* independentes (dois genes mitocondriais combinados, COI e CytB, e os dois loci nucleares, RAG2 e S7).

Como o \*BEAST necessita de uma designação a *priori* sobre a identificação das espécies, nós tratamos as linhagens mitocondriais observadas para o COI e CytB (Fig. S2) como espécies candidatas. Seguindo essa afirmação temos: *S. affinis*, *S. franciscanus*, *S. sp.*

Amazonas e *S. sp.* Araguaia; nós dividimos *S. brasiliensis* e *S. hilarii* em cinco espécies candidatas: duas atualmente denominadas de *S. brasiliensis* (Alto Paraná e PUL – Paraguai, Uruguai e Lagoa dos Patos) e três para *S. hilarii* (duas da bacia do São Francisco e uma do Alto Paraná) para inferir tempos de divergência entre e dentro das espécies (ver secção a seguir). Apesar das análises de DNA *barcoding* identificarem duas potenciais espécies para *S. hilarii*, as topologias mitocondriais, incluindo o D-loop identificaram três clados. Por essa razão, assumiremos três linhagens visando compreender as verdadeiras relações filogenéticas entre elas.

Três cadeias independentes de Markov foram realizadas, iniciando a partir de árvores aleatórias, com um número de 200 milhões de gerações e amostradas a cada 10 mil gerações. Terminadas as corridas, nós as combinamos utilizando o LogCombiner 1.8, do pacote BEAST 1.8, e descartamos 25% das gerações (*burn-in*). A mixagem apropriada dos dados foi verificada com o TRACER v1.5 (Rambaut & Drummond, 2007), e o tamanho efetivo da amostragem (ESS) de 200 ou mais foi necessário para parâmetros considerados importantes (probabilidade posterior, *a priori* e *likelihood*, e tempo do ancestral comum mais recente).

### **Estimativas de tempos de divergência**

Os tempos de divergência foram estimados sob um relógio molecular relaxado com uma distribuição de lognormal no \*BEAST 1.8. Nossa primeira tentativa para estimar os tempos de divergência foi a calibração a partir do único registro fóssil do gênero (Cione & Azpeculicueta, 2013). Entretanto, esta análise não providenciou resultados, uma vez que a probabilidade posterior da árvore inicial foi zero, impedindo o prosseguimento da cadeia. Esse problema sugere a existência de uma incompatibilidade entre os limites especificados na calibração e a variação molecular dos marcadores. Por esta razão, optamos pela calibração a partir de um evento biogeográfico. Utilizamos o soerguimento da cadeia Oriental da

Cordilheira dos Andes, que marca a separação entre as paleobacias do rio Magdalena e do Amazonas (11.8 Ma – Hoorn et al., 1995), como o evento responsável pela divisão entre a espécie *S. affinis* e os demais *Salminus*. Os seguintes parâmetros para o relógio foram implementados na análise: distribuição normal para o *prior* do tempo de divergência do ancestral comum mais recente (MRCAs, em inglês, *most recent common ancestor*) com média de 11.8 Ma e desvio padrão de 2 Ma (95% HPD, *highest posterior density*: 7.88 e 15.72 Ma), distribuição uniforme (intervalo de 0–1) para o *prior* da taxa média do relógio (parâmetro *ucl.d.mean*) e modelo de especiação Yule.

Para facilitar nossa compreensão sobre quais processos históricos são importantes, nós estimamos a área de distribuição dos ancestrais das espécies, através da abordagem de máxima verossimilhança empregada pelo pacote “BioGeoBEARS” (*Biogeography with Bayesian and Likelihood Evolutionary Analysis in R scripts*, Matzke, 2013) implementado no R. Para realizar a análise de estimativa de áreas ancestrais, nós fornecemos seis unidades hidrográficas: Magdalena (Mg), Amazonas (Am), Tocantins-Araguaia (ToA), São Francisco (SFr), Alto Paraná (AP) e Paraguai, Uruguai e Lagoa dos Patos (PUL).

O pacote BioGeoBEARS estima a distribuição geográfica dos nós ancestrais de uma filogenia calibrada. Uma otimização da função de verossimilhança é feita através da incorporação de uma série de parâmetros que descrevem a taxa ou o comprimento relativo de vários eventos biogeográficos, como expansão de área, extinção de área e cladogênese através da especiação por vicariância e simpatria. BioGeoBEARS compara os modelos que combinam diferentes parâmetros, utilizando o critério de informação Akaike (AIC) e peso do AIC<sup>6</sup> (AIC<sub>w</sub> – Matzke, 2013).

---

<sup>6</sup> Embora o AIC seja reconhecido como o principal medidor para seleção de modelos, apresenta um inconveniente: os valores podem apresentar uma falta de clareza, apesar de valores elevados representarem menos qualidade de ajuste aos dados empíricos. O peso do AIC (AIC<sub>w</sub>) para o modelo é o valor de AIC dividido pela soma de todos os modelos. Isso quer dizer que o valor de AIC<sub>w</sub> representa a probabilidade do melhor modelo, dado o conjunto de modelos testados (Wagenmaker & Farrel, 2004).

Seis modelos biogeográficos foram comparados no BioGeoBEARS: (I) DEC, modelo de dispersão, extinção e cladogênese que é igualmente empregado no LAGRANGE (Ree, 2005); (II) DEC com efeito fundador (DECj); (III) DIVALIKE, assim chamado por ser a versão do DIVA (dispersão-vicariância) com o emprego da verossimilhança (Ronquist, 1997); (IV) DIVALIKE com efeito fundador (DIVALIKEj); (V) BayAreaLIKE, também com o emprego da verossimilhança (Landis et al, 2013); e, (VI) BayAreaLIKE com efeito fundador (BayAreaLIKEj). Nós permitimos o máximo de 3 áreas por nó, número máximo de bacias, da presente análise, que poderiam estar conectadas no passado (proto-Amazonas era constituído pelo Magdalena, Amazonas e Tocantins-Araguaia – Lundbert et al, 1998). A análise foi conduzida sem o grupo externo, pois este acarreta certas limitações para a metodologia (ver Yu et al., 2013).

Após esses procedimentos, nós correlacionamos os tempos de divergência das espécies e linhagens com os eventos geoclimáticos conhecidos com a finalidade de elucidar quais processos históricos foram responsáveis pela diversificação de *Salminus*. Posteriormente, alguns desses eventos serão testados através de hipóteses alternativas.

### **Testando cenários biogeográficos com *Approximate Bayesian Computation* (ABC)**

Nós empregamos todos os marcadores mitocondriais (COI, CytB e D-loop) e nucleares (RAG2 e S7) na estatística ABC (Beaumont et al., 2002) para testar qual cenário biogeográfico melhor corresponde à estrutura filogeográfica das espécies, fortemente suportadas por nossas análises filogenéticas (ver resultados): *S. brasiliensis* do Alto rio Paraná e *S. brasiliensis* dos rios Paraguai, Uruguai e Lagoa dos Patos (PUL); *S. hilarii* do Alto Paraná e duas linhagens reciprocamente monofiléticas de *S. hilarii* da bacia do rio São Francisco); e, *S. sp.* Amazonas e *S. sp.* Araguaia. Essas espécies foram escolhidas para o teste

de cenários, pois na primeira etapa das análises (estimativa de tempo e a correlação com eventos conhecidos) ambos cenários biogeográficos se mostraram prováveis (ver resultados).

*Definindo os cenários:* Usando DIYABC v2.0.4 (Cornuet et al., 2014), nós testamos duas classes de cenários biogeográficos independentemente para cada espécie descrita acima: um cenário de geodispersão representando a hipótese hidrogeológica e outro cenário de vicariância correspondendo a hipótese paleogeográfica (Fig. 1). Para cada cenário, as populações atuais foram configuradas para o tempo  $t_0$ , e a divergência entre elas para o tempo  $t_3$ . No caso das linhagens de *S. brasiliensis* e das espécies de *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia* os cenários foram desenhados da seguinte maneira: para o cenário de vicariância, assumimos uma população ancestral, com tamanho efetivo denominado  $N_a$ , que se dividiu em duas populações de tamanho efetivo menor que  $N_a$  ( $N_1$  e  $N_2$ ) no tempo  $t_3$ . Essas populações-filhas evoluíram independentemente e no tempo  $t_0$  representam linhagens, no caso de *S. brasiliensis*, ou espécies diferentes, no caso de *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*. O cenário de geodispersão assume que um pequeno número de fundadores ( $N_{1f}$  e  $N_{2f}$ , onde “f” significa fundador), originado a partir de uma bacia-fonte, colonizou a bacia adjacente depois de um evento de captura de cabeceira em  $t_3$  e consequente expansão populacional em  $t_1$ . Há dois cenários dentro desta classe porque assumimos que a identidade da bacia-fonte pode ser diferente. Assim como a classe do cenário de vicariância, as populações evoluíram independentemente depois do evento fundador até o tempo  $t_0$ . A grande diferença entre os dois cenários é a mudança do tamanho efetivo das populações-filhas em  $t_3$  (Fig. 1, 3 a-b). No caso de *S. hilarii*, a qual é possível observar três linhagens mitocondriais bem definidas nas topologias (Fig. S2 - duas da bacia do rio São Francisco e uma do Alto rio Paraná), nós adicionamos mais parâmetros ( $t_s$  – tempo de divergência entre as linhagens simpátricas da bacia do rio São Francisco – e número de populações) e adaptamos os cenários. A escolha do

melhor cenário, para a espécie, foi feita em duas etapas: Inicialmente, cada classe de cenário biogeográfico foi testada separadamente (geodispersão com o rio São Francisco sendo a bacia-fonte; geodispersão com o Alto Paraná sendo a bacia-fonte; e, o cenário de vicariância - Fig. S1 e resultados estão no Tabela S3 na informação suporte). A necessidade de cada classe ser testada separadamente se deve à presença das duas linhagens do São Francisco (SF1 e SF2), uma vez que a identidade de qual linhagem participou do evento t3 também é importante. Portanto, existem dois modelos para cada classe. A segunda etapa comparou os modelos com maior probabilidade posterior de cada classe de cenário estimada na primeira rodada para decidir qual cenário reflete a história evolutiva da espécie (Fig. 3c).

*Distribuição dos priors dos parâmetros e estatísticas sumárias.* Todos os parâmetros (tamanho populacional, tempo dos eventos demográficos e taxas mutacionais) e distribuição dos priors utilizados em nossos cenários estão sumarizados no material de suporte (Tabela S4). Os valores dos priors de tamanho populacional efetivo foram considerados com distribuição uniforme. Os priors das estimativas de tempo foram medidos em gerações e os valores foram baseados na árvore de coalescência (árvore de espécie gerada no \*BEAST). Nós utilizamos dois anos como o tempo de geração para todas as espécies, baseado nos dados ecológicos de machos da espécie *S. brasiliensis* (Godoy, 1975). A taxa média de mutação (por sítio por geração) foi atribuída para cada locus com distribuição uniforme, variando de  $10^{-9}$  a  $10^{-8}$  para os marcadores nucleares e de  $10^{-8}$  a  $10^{-7}$  para os mitocondriais (Cornuet et al., 2010). Para a comparação dos cenários, nós empregamos as seguintes estatísticas sumárias (dados de diversidade genética): número de haplótipos e número de sítios segregantes dentro de cada população, e número de haplótipos e  $F_{st}$  (índice de fixação) entre as populações. Cada cenário competidor foi simulado um milhão de vezes.

*Comparação de cenários.* Para determinar o cenário mais provável, nós computamos a probabilidade posterior dos três cenários competidores utilizando uma regressão logística com análise linear discriminante (Cornuet et al., 2010) em 1% dos dados simulados que estão próximos aos dados observados. Cenários vencedores possuem alto valor de probabilidade posterior com 95% HPD sem sobreposição com as probabilidades posteriores dos demais cenários. Para investigar a robustez do cenário vencedor, isto é, se ele foi escolhido corretamente, nós avaliamos as taxas de erro tipo I (a probabilidade que os dados simulados sob um cenário vencedor foram incorretamente atribuídos a outro cenário) e erro tipo II (a probabilidade que o conjunto de dados simulados sob um outro cenário foram atribuídos ao cenário vencedor). Para essa etapa, 500 pseudodados observados (dados simulados) foram produzidos por cenários, com os valores dos parâmetros gerados a partir da informação dada na etapa “*Distribuição dos priors dos parâmetros e estatísticas sumárias*”. As probabilidades posteriores dos cenários competidores foram avaliadas para cada conjunto de pseudodados observados, usando a metodologia descrita para os dados observados.

*Estimativa e precisão dos parâmetros e checagem do modelo.* Depois de definir o cenário vencedor em cada espécie, estimamos os valores dos parâmetros desse cenário através de uma regressão linear local (Beaumont et al., 2002) utilizando 1% dos dados simulados, e aplicando a transformação *logit* para todos os parâmetros (Cornuet et al., 2008). Nós avaliamos a precisão de cada parâmetro estimado através do cálculo da média relativa do erro absoluto (RMAE, em inglês, *relative median of the absolute error*), que é a média do erro absoluto dividido pelo valor do parâmetro verdadeiro dos 500 pseudodados observados. Finalmente, nós realizamos uma etapa de verificação do modelo para avaliar como o cenário vencedor se “encaixa” com os dados observados. Para isso, realizamos uma simulação de 10.000 pseudodados observados para o cenário vencedor. As estatísticas sumárias empregadas nessa

etapa precisam ser diferentes daquelas já empregadas, para evitar uma sobre-estimativa dos resultados (Cornuet et al., 2010). Nós utilizamos a variância das diferenças par-a-par e D de Tajima como estatística sumária nas análises dentro da população, e número de sítios segregantes e média das diferenças par-a-par dentro (W) e entre (B) amostras para estimações entre populações. Uma análise de componentes principais (PCA, em inglês, *principal components analysis*) aplicada em vetores de testes estatísticos foi utilizado para visualmente se observar como ocorre o “encaixe” entre dados simulados e observados.

## RESULTADOS

### Relações filogenéticas entre as espécies de *Salminus*

A filogenia do gênero inferida a partir dos marcadores moleculares COI, CytB, S7 e RAG2 mostrou que todas as espécies do gênero (4 espécies nominais válidas e duas candidatas, *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*) são monofiléticas. Ao compararmos as topologias dos genes, entretanto, observamos várias inconsistências quanto ao nó basal e a monofilia de *S. brasiliensis* (Fig. S2). As topologias dos marcadores mitocondriais, que apesar de formarem os mesmos agrupamentos, apresentaram configurações diferentes, evidenciando a parafilia das linhagens de *S. brasiliensis* (Alto Paraná e PUL) e o clado basal constituído por *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*, suportado apenas pelo COI. Por outro lado, o marcador nuclear S7 mostrou a espécie *S. brasiliensis* como sendo monofilética. RAG2 não possuiu resolução para definir como as linhagens de *S. brasiliensis* estão relacionadas. Diferente do observado para COI, RAG2 suporta *S. affinis* como a espécie posicionada na base da topologia (Fig. S2).

A árvore de espécies (Fig. 4) evidenciou *S. affinis*, única espécie transandina, como e espécie-irmã dos demais *Salminus*, que formam dois grandes clados com alto valor de

suporte. O primeiro clado, denominado grupo Noroeste, é constituído por *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*. O outro clado é composto por *S. brasiliensis*, *S. franciscanus* e *S. hilarii*, e foi denominado de grupo Sudeste. No grupo Noroeste, *S. sp. Amazonas* apresenta amostras de diferentes localidades: Alto rio Amazonas e rio Madeira. Entretanto o suporte estatístico entre ambas foi baixo (Nó 4, 0.68). Por esta razão nós iremos considerar essas populações como uma única linhagem, denominada Amazonas, no teste de hipóteses biogeográficas (secção Análise ABC). No grupo Sudeste, *S. franciscanus* é a espécie-irmã de *S. brasiliensis* e *S. hilarii*. O valor do suporte do nó (6) entre essas duas últimas foi considerado baixo (0.6). O mesmo ocorre entre as linhagens simpátricas de *S. hilarii* da bacia do São Francisco (Nó 9, 0.90) (Fig. 4).

### **Tempos de divergência entre as espécies de *Salminus***

A análise do relógio molecular sugere que os processos de diversificações em *Salminus* iniciaram no Mioceno Superior (Fig. 4). O MRCA de *Salminus*, calculado a partir do evento biogeográfico descrito anteriormente, nó 1, viveu há aproximadamente 11.05 Ma, com um intervalo de confiança (95% HPD) de 7.02 – 14.98 Ma. O seguinte evento de divergência foi entre o grupo Noroeste (bacias dos rios Amazonas e Araguaia) e o grupo Sudeste (Bacia Platina – rios Paraná, Paraguai e Uruguai – Lagoa dos Patos e do rio São Francisco) que ocorreu há 7.76 Ma (95% HPD 4.01-11.64 Ma). Os demais processos de diversificação ocorreram durante o Plioceno Inferior. Nós também estimamos temporalmente a diversificação das linhagens de *S. brasiliensis* (as linhagens Alto Paraná e PUL divergiram há 0.36 Ma, 95% HPD 0.11 – 0.72 Ma) e *S. hilarii* (as linhagens presentes no Alto Paraná e São Francisco se separaram há 1.36 Ma, 95% HPD 0.51 – 2.53 Ma; e as linhagens simpátricas da bacia do São Francisco divergiram há 0.68 Ma, 95% HPD 0.17 – 1.44 Ma). Para *S. sp.*

Amazonas e *S. sp. Araguaia* a divergência ocorreu há 2.747 Ma, 95% HPD 0.98-5.17 Ma (Fig. 4).

Dos seis modelos biogeográficos testados pelo BioGeoBEARS, o modelo de dispersão e vicariância com efeito fundador (DIVALIKEj) apresentou o melhor ajuste aos dados empíricos, sendo suportado por AICw ( $>0.90$ ). O resultado sugeriu que a área de distribuição mais provável do MRCA de todos os *Salminus* tenha sido na região do proto-Amazonas (rios Magdalena, Amazonas e Tocantins-Araguaia – Fig. S3). O modelo recuperou também que o ancestral dos grupos Noroeste e Sudeste estava presente no paleo-Amazonas (rios Amazonas e Tocantins – Araguaia). O ancestral do grupo Noroeste continuou no paleo-Amazonas onde divergiu para formar *S. sp. Araguaia* e *S. sp. Amazonas*. Já o ancestral do grupo Sudeste estava no rio São Francisco e posteriormente alcançou as demais bacias do escudo Brasileiro (rios Paraná, Paraguai, Uruguai e Lagoa dos Patos).

### **Testando hipóteses biogeográficas com análise ABC para *S. brasiliensis*, *S. hylarii*, e *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia***

A reconstrução demográfica utilizando a abordagem ABC identificou o cenário de vicariância (hipótese paleogeográfica) como o evento mais provável para explicar a estrutura filogeográfica atual de *S. brasiliensis* e a divergência entre *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia* (probabilidade posterior,  $P$ , foi 0.4642 e 0.4875, respectivamente). Por outro lado, o cenário de geodispersão (hipótese hidrogeológica) foi o evento mais provável para explicar a estrutura de *S. hylarii* ( $P=0.8312$ ) (Tabela 1).

Embora o cenário vencedor de cada espécie tenha apresentado altas taxas de erro do tipo I, as taxas de erros do tipo II foram baixas (Tabela S5) sugerindo alta confiança no cenário escolhido pela análise ABC. Valores posteriores dos parâmetros foram estimados apenas para os cenários vencedores (Tabela 2). No cenário de vicariância de *S. brasiliensis*, o

tamanho médio efetivo das linhagens do Alto Paraná e PUL foram  $N_{AP} = 85300$  (95% HPD 37900-214000) e  $N_{PUL} = 136000$  (95% HPD 614000-332000), respectivamente. Ambas linhagens divergiram de uma população ancestral com tamanho médio efetivo de 685000 (95% HPD 269000-970000) no tempo  $t_3=0.892$  Ma (95% HPD 0.416-1.17 Ma).

Para as espécies *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*, o cenário com a maior probabilidade posterior mostrou uma população ancestral ( $N_a=582000$ , 95% HPD 204000-956000) sofrendo uma divisão no tempo  $t_3= 2.36$  Ma (95% HPD 1.178-4.54 Ma). A média dos tamanhos efetivos das linhagens no presente ( $t_0$ ) foi de 155000 indivíduos (95% HPD 57800-442000) para *S. sp. Amazonas* ( $N_{AM}$ ) e 30100 (95% HPD 12300-115000) indivíduos *S. sp. Araguaia* ( $N_{ToA}$ ) (Tabela 2).

O cenário vencedor para *S. hilarii* assumiu que bacia do Alto rio Paraná, capturou parte da bacia do rio São Francisco (bacia-fonte). Esta geodispersão ocorreu há 1.952 Ma ( $t_3$ , 95% HPD 1.046-3.24 Ma). Um pequeno número de fundadores ( $N_{APf} = 5040$ , 95% HPD 358 – 9740), originado a partir da linhagem denominada SF1 da bacia do rio São Francisco, colonizou o Alto rio Paraná e se expandiu há 1.592 Ma (95% CI 0.77-2.58 Ma). Devido a existência de duas linhagens dentro da bacia do rio São Francisco, nós também estimamos o tempo de divergência entre elas (SF1 e SF2) ( $t_s= 0.606$  Ma, 95% HPD 0.216-1.086 Ma). O processo biogeográfico responsável por esta divergência não foi especificado porque as linhagens são simpátricas e os cenários testados resultam de diversificação alopátrica. Os tamanhos efetivos médios no presente ( $t_0$ ) para a linhagens foram  $N_{SF1}=446000$ ,  $N_{SF2}=441000$  e  $N_{AP}=460000$  (Tabela 2).

Avaliando o desempenho da estimativa da distribuição posterior dos parâmetros, exceto  $N_{APf}$  (tamanho da população fundadora – 0.835) e  $N_{SF2}$  (tamanho populacional da linhagem 2 da bacia do rio São Francisco – 0.337), ambos calculados para *S. hilarii*,

mostraram baixos valores RMAE. Isso indica que os parâmetros estimados para a análise ABC, nos cenários vencedores, são confiáveis (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

### Filogenia de *Salminus*

A investigação das relações evolutivas entre as espécies de *Salminus* refutou as hipóteses propostas previamente, baseada em caracteres morfológicos (Lima, 2006) e em evidência molecular (Abe et al., 2014). Em tese não publicada, Lima (2006) não obteve caracteres morfológicos suficientes para estabelecer todas as relações entre as espécies. Entretanto, revelou que *S. brasiliensis* e *S. franciscanus* são espécies-irmãs, assim como *S. affinis* e *S. sp.* (para o autor, *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia* formam uma única espécie). Essa hipótese é suportada por Abe et al. (2014), que adicionalmente propõe *S. hilarii* como espécie irmã dos demais *Salminus*, cenário bem diferente daquele que estamos propondo (Fig. 4).

Com o intuito de compreender as razões pelas quais os dados moleculares são divergentes, nós reanalisamos individualmente as árvores gênicas utilizando apenas os *Salminus* amostrados em Abe et al. (2014) (dados não mostrados). Entre os marcadores utilizados pelos autores, apenas o RAG2 apresentou uma topologia distinta em relação aos demais marcadores: *S. hilarii* está situada na base da topologia. Essa configuração não era esperada, afinal em todos os marcadores, inclusive em nossos dados, *S. hilarii* apresenta uma estreita relação com *S. franciscanus* e *S. brasiliensis*. Diante dessa incongruência, nós decidimos realizar uma nova análise utilizando todas as sequências do RAG2 disponíveis para a família Bryconidae no GenBank (Oliveira et al., 2011; Abe et al., 2014), incluindo também a do presente estudo. Os resultados revelaram que o único espécime de *S. hilarii* utilizado por

Abe et al. (2014) não agrupa com os *Salminus*, cujo suporte de agrupamento é máximo. Esse espécime está agrupado com os demais espécimes de *Brycon*. Por essa razão, acreditamos que para o RAG2 essa sequência tenha sido erroneamente denominada como *S. hilarii*, quando na verdade trata-se de um espécime do gênero *Brycon*. Pelo fato dos genes nucleares oferecerem maior resolução para os nós mais antigos da topologia, esse erro provocou uma resolução equivocada sobre as relações evolutivas entre as espécies de *Salminus*. Diante desse problema, a filogenia molecular do gênero *Salminus* apresentada neste estudo é mais coerente, sendo a primeira com ampla amostragem e distribuída em distintas bacias hidrográficas, capaz de detectar as estruturações intraespecíficas e resolver as relações interespecíficas.

A análise *multiloci* corroborou a hipótese de que existem mais unidades evolutivas do que espécies nominais (Abe et al., 2014; Machado et al., no prelo). Segundo Abe et al., (2014) *Salminus* estaria constituído por cinco unidades fortemente sustentadas (*S. affinis*, *S. brasiliensis*, *S. franciscanus*, *S. hilarii* e *S. sp.*). Por outro lado, para Machado et al. (no prelo) a análise de DNA *barcoding* associada ao marcador nuclear RAG2 suportou a existência de seis unidades (*S. affinis*, *S. brasiliensis*, *S. franciscanus*, *S. hilarii*, *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*), assim como os resultados do presente estudo. A diferença no número de unidades evolutivas se deve unicamente ao fato de Abe et al. (2014) terem usado um único indivíduo para representar as espécies, não sendo possível detectar que *S. sp.* é constituída por duas unidades (*S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*). Há dois pontos divergentes entre os nossos resultados e Machado et al. (no prelo). O primeiro deles é a parafilia de *S. brasiliensis*. Machado et al. (no prelo) empregando as análises de DNA *barcoding* fortemente sustentou a existência de duas unidades em *S. brasiliensis*. No entanto, como o marcador nuclear (RAG2) não foi elucidativo, os autores recomendaram cautela quanto à definição do real status taxonômico da espécie. A análise *multiloci* do presente estudo, não evidenciou a parafilia de *S. brasiliensis*. Por hora, concluímos que esta espécie deve ser considerada uma única unidade

taxonômica com estruturas filogeográficas que resultaram de um processo de diversificação alopátrica (ver demais secções). Outro ponto divergente foi a recíproca monofilia observada no presente trabalho entre indivíduos de *S. hilarii* das bacias do rio São Francisco e Alto rio Paraná (Fig. 4). Diferentemente, para Machado et al. (no prelo), essa monofilia recíproca não existe: há duas unidades mitocondriais, uma constituída apenas por indivíduos da bacia do rio São Francisco e outra formada por espécimes do Alto rio Paraná e uma parte do rio São Francisco. Os autores sugerem que a não-monofilia recíproca das bacias hidrográficas seja resultado de um contato secundário (histórico, mais provável, ou por ação antrópica). Os três marcadores mitocondriais que utilizamos também confirmaram a não monofilia recíproca, apesar de identificar três e não duas linhagens mitocondriais. Portanto, confirmamos a hipótese de contato secundário, detectada apenas pelos mitocondriais, marcadores que providenciam sinais de eventos de diferenciação mais recentes do que os nucleares (ver discussão sobre História evolutiva do gênero).

Todas as relações interespecíficas foram fortemente suportadas, a exceção foi entre *S. brasiliensis* e *S. hilarii* (nó 6,  $P=0.6$ ). Acreditamos que essa baixa probabilidade bayesiana posterior reside na incongruência entre as árvores mitocondriais e nucleares. Para testar essa hipótese, realizamos o teste ILD (*Incongruence Length Difference test* – Farris et al., 1994) utilizando o método de Máxima Parcimônia no PAUP\* v4.0b10 que avalia o conflito e a incongruência entre as partições (genes) utilizadas nesta análise. O valor de  $P<0.01$  rejeitou a hipótese nula de que ambos genomas são congruentes. Conflitos entre filogenias mitocondriais e nucleares são comuns e surgem devido a vários processos (ver Dávalos et al., 2012). Provavelmente, para o nosso conjunto de dados, essas diferenças sejam resultantes de características intrínsecas de cada genoma (Funk & Omland, 2003). Contudo, como apenas o S7 apresenta resolução dessa relação interespecífica, identificando a monofilia de *S.*

*brasiliensis*, ao contrário dos outros dois marcadores mitocondriais, não descartamos a possibilidade de estarmos diante de um caso de ILS para esse marcador nuclear.

### **História evolutiva de *Salminus***

O primeiro ponto de diversificação observado na topologia do gênero foi o nó (1) calibrado através do evento biogeográfico. O ancestral comum mais recente do gênero *Salminus* data do Mioceno Superior (11.05 Ma, 95% HPD 7.02 – 14.98 Ma) e estava distribuído por todo proto-Amazonas (Fig. 4, Fig. S3). Antes do soerguimento da Cadeia Oriental dos Andes, não havia individualização das bacias hidrográficas modernas no noroeste do continente sul-americano. Esta região estava coberta por um sistema de lagos, cujo conjunto foi denominado de Lago Pebas (Lundberg et al., 1998). Aproximadamente a 11.8 Ma, a direção do fluxo das águas da várzea do Magdalena mudou completamente de sentido: do leste/sudeste para oeste. Esta troca de sentido indica a existência de uma nova e importante área a leste (Cordilheira Oriental dos Andes), resultante da colisão entre as placas Nazca com a margem noroeste da América do Sul (Hoorn et al., 1995). O surgimento da cadeia de montanhas contínuas separou permanentemente as populações do ancestral de *Salminus*. Esse cenário de vicariância é extensivamente discutido para explicar as divergências entre a ictiofauna cis e transandina (Sivasundar et al., 2001; Montoya-Burgos, 2003; Albert et al., 2006).

Após o soerguimento da cadeia Oriental dos Andes, parte da população ancestral se diverge na bacia do Magdalena, dando origem à *S. affinis*, e parte continua no Lago Pebas. Como resultado dessa orogênese andina ocorre a erosão do Arco Purus, uma importante barreira que dividia o paleo-Amazonas em duas porções: leste, que desaguava no oceano Atlântico, e oeste, que desaguava no Mar do Caribe (Lundberg et al., 1998). Com o estabelecimento do curso moderno do paleo-Amazonas (oeste-leste), essas populações

ancestrais alcançam o paleo-Tocantins-Araguaia. É após esses eventos que outra cladogênese ocorre dentro do gênero *Salminus* (nó 2), marcando a separação do grupo Noroeste (bacias dos rios Amazonas e Tocantins-Araguaia) e Sudeste (bacias dos rios Paraná, Paraguai, São Francisco e Uruguai e drenagem da Lagoa dos Patos) (Fig. 4). O MRCA dos dois grupos estava no paleo-Amazons/Tocantins-Araguaia há 7.76 Ma (95% HPD 4.01-11.64 Ma), onde parte dele geodispersou para as bacias do Escudo brasileiro, provavelmente através de uma captura de cabeceira para a bacia do rio São Francisco (formando o grupo Sudeste), e parte continuou na região, dando origem ao grupo Noroeste (Fig. 4, Fig. S3).

A história biogeográfica da ictiofauna do Tocantins-Araguaia e São Francisco são distintas. Enquanto a ictiofauna do rio Tocantins é próxima à amazônica, a do São Francisco é híbrida, apresentando relações com as bacias hidrográficas adjacentes (Lima & Caires, 2011). Entre ambas existe a Serra Geral do Tocantins, uma estrutura tectônica datada desde o Cretáceo que separa as cabeceiras dessas bacias (Villela & Nogueira, 2011). O processo de erosão da serra criou um fenômeno chamado de “águas emendadas”, onde as duas bacias compartilham cabeceiras. É provável que há 7.76 Ma tenha ocorrido um processo de geodispersão nessa região para o São Francisco, permitindo a expansão de um grupo que se tornará o ancestral do grupo Sudeste.

Outra provável rota de geodispersão histórica entre os dois sistemas hidrográficos é pela costa norte-nordeste. De acordo com Hubert et al. (2007), dois eventos de geodispersão entre as paleobacias ocorreram no gênero *Serrasalmus*: um há 7.4 Ma (coincidente com nossa estimativa temporal) e outro há 2.3 Ma. Os autores argumentaram que a regressão marinha do Mioceno promoveu a coalescência das fozes dos paleorios, criando conexões temporárias entre os paleorios amazônicos e do nordeste brasileiro, favorecendo a expansão de área do ancestral para o Escudo Brasileiro. Hubert & Renno (2006), a partir da compilação de dados de distribuição de 601 espécies de Characiformes, também identificaram essa rota.

Conforme a sequência de eventos descrita anteriormente, o ancestral do grupo Noroeste permaneceu no paleo-Amazonas. O evento de cladogênese desse grupo (nó 3) ocorreu há 2.7 Ma (95% HPD 0.98-5.17 Ma) e marca a separação entre *S. sp. Araguaia* e *S. sp. Amazonas* (Fig. 4). Essa separação provavelmente está relacionada com o rompimento da conexão entre as paleobacias do Amazonas e Tocantins-Araguaia. Dados geológicos e geomorfológicos indicam que a intensa atividade neotectônica das falhas geológicas no baixo Amazonas (local onde hoje existe a foz de ambos os rios), culminou na mudança de rota do paleo-Tocantins durante o Plio-Pleistoceno (Rossetti & Valeriano, 2007). Essa interrupção na descarga direta do paleo-Tocantins dentro do paleo-Amazonas, foi apontada como um evento de vicariância responsável pela especiação entre as espécies *Inia araguaiaensis* (boto-do-araguaia) e *Inia geofrensis* (boto-cor-de-rosa) há 2.08 Ma (95% HPD 0.811-3.744 Ma) (Hrbek et al., 2014), coincidindo com nossos resultados.

Entretanto, a análise do BioGeoBEARS aponta um cenário diferente para o clado Noroeste (Fig. S3). A área ancestral foi estimada como sendo no rio Amazonas, o que resultaria na ocorrência de um evento de captura de cabeceira entre o Amazonas e o Tocantins, após o estabelecimento das bacias. Claramente é um artefato da análise, que não leva em consideração o dinamismo das conexões das bacias hidrográficas. Apesar de algumas evidências de captura de cabeceira entre o rio Tocantins-Araguaia e a bacia adjacente do rio Xingu (tributário do rio Amazonas) (Lima & Caires, 2011), nós não acreditamos que esse cenário tenha ocorrido no grupo. A razão está na distribuição atual disjunta do gênero dentro da bacia Amazônica: os registros apontam espécimes presentes apenas nas regiões mais altas do Ocidente do rio Amazonas (rios Madeira, Ucayali, Juruá, Marañon e Purus) e Tocantins-Araguaia (Lima, 2006). Os padrões biogeográficos de espécies com essa distribuição disjunta e relacionadas a altitude ainda não foram elucidados, porém, de acordo com Lima e Ribeiro (2011) estão relacionados à *constraints* ecológicos e eventos históricos. Para esclarecermos se

o cenário de geodispersão pode ou não ter ocorrido, iremos testá-lo como um cenário alternativo através da abordagem ABC.

Os eventos de cladogênese do grupo Sudeste, envolvendo as bacias do Alto rio Paraná e rio São Francisco, não são característicos de especiação por vicariância, mas sim por sucessivas geodispersões, uma vez que as bacias hidrográficas não formam grupos monofiléticos (Hubert et al., 2007). A estrutura geológica do Escudo Brasileiro favorece esses eventos, com suas inúmeras falhas geológicas que continuamente estão sendo reativadas, promovendo rearranjos entre as bacias e consequente troca de ictiofauna (Ribeiro, 2006, Buckup, 2011; Ribeiro & Menezes 2015). O surgimento da bacia do rio São Francisco e do Alto rio Paraná é muito antigo, remonta o tectonismo associado à quebra da Gondwana (Potter, 1997, Ribeiro, 2006). Entre as cabeceiras dessas bacias existe um sistema de falhas geológicas conhecido como Descontinuidade Crustal do Alto Rio São Francisco (DCARSF), que apresenta atividade recorrente desde o Pré-Cambriano (Saadi, 1993). Com as contínuas reativações da DCARSF, as geodispersões se tornaram importantes eventos promotores de diversificação dentro dos gêneros *Salminus*, *Hypostomus* (5.7 – 6.4 Ma - Montoya-Burgo, 2003) e alguns Characiformes (Hubert & Renno, 2006). O MRCA do grupo Sudeste estava no paleorio São Francisco há 4.27 Ma (95% HPD 1.88-7.23 Ma), quando parte dele se geodispersou para o Alto rio Paraná (estimativa de área ancestral para o MRCA das espécies *S. hilarii* e *S. brasiliensis* – Fig. S3).

*S. brasiliensis* apresenta duas linhagens alopátricas bem definidas, cujo processo de diversificação entre elas deve estar relacionado à separação das bacias hidrográficas que ocupam (Alto rio Paraná e os rios Paraguai, Uruguai e drenagem da Lagoa dos Patos). Espécies com a distribuição similar à *S. brasiliensis* também apresentam essa estruturação entre o Alto rio Paraná e os demais sistemas da Bacia Platina (Sivasundar et al.; 2001; Bellafrente et al., 2013; Piálek et al., 2012). O Alto rio Paraná, dado sua composição de

espécies, características ecológicas e história evolutiva, é considerada uma distinta ecorregião em relação às bacias do Baixo rio Paraná, rios Paraguai e Uruguai (Abell et al., 2008). A história biogeográfica da região é complexa e está associada com sucessivas reativações de fraturas geológicas (Bartorelli, 2004). Essas reativações neotectônicas promoveram tanto rearranjos entre essas drenagens (Ribeiro & Menezes, 2015) quanto a formação de importantes barreiras geográficas (cachoeiras de Apipé, Iguaçu, Moconá e Sete Quedas, por exemplo – Bartorelli, 2004). Portanto, dois distintos cenários explicariam a diversificação das linhagens de *S. brasiliensis*, que ocorreu há 0.36 Ma (95% HPD 0.11 – 0.72 Ma): vicariância e geodispersão.

A cachoeira de Sete Quedas, antes do seu afogamento para a construção do reservatório de Itaipu, foi uma importante barreira geográfica impermeável entre o Alto rio Paraná e as demais sistemas hidrográficos que compõem a bacia Platina. Não existe informação sobre a idade absoluta dessa cachoeira. Segundo Bartorelli (2004), eventos neotectônicos do Pleistoceno Médio até o último máximo glacial (1.5 – 0.1 Ma) foram os responsáveis pelas gêneses de cachoeiras na bacia do rio Paraná. É provável que com o surgimento de Sete Quedas durante esse período, a população ancestral das linhagens de *S. brasiliensis*, que estava distribuída por toda a bacia Platina, tenha ficado isolada e divergido alopatricamente. Esse evento de vicariância também é utilizado para explicar os processos de diversificação em *Prochilodus lineatus* (Sivasundar et al., 2001) e no grupo *Crenicichla lacustris* (Piálek et al., 2012).

Apesar de pouco provável, devido às estimativas temporais, nós não descartamos o cenário de geodispersão, que poderia ter ocorrido do Alto rio Paraná para o rio Paraguai. Ambas as bacias possuem cabeceiras adjacentes que poderiam ter sido utilizadas como paleo-rotas. De acordo com Menezes et al. (2008), as paleo-rotas teriam surgido durante o processo tectônico de formação do Pantanal, planície alagada encontrada no Alto rio Paraguai. Os

autores destacam que o limite oeste do Alto rio Paraná era mais deslocado para o Ocidente do que atualmente, e que após a reativação de uma falha tectônica associada às atividades de compressão nos Andes, parte dele foi capturado pelo rio Paraguai (Assine, 2004 citado por Menezes et al., 2008). Essa captura de cabeceira permitiu que parte da população ancestral de *S. brasiliensis* tenha geodispersado do Alto rio Paraná para o Alto rio Paraguai. Posteriormente, o ancestral se espalhou por todo rio Paraguai, alcançando a bacia do rio Uruguai. A estimativa de tempo dessa captura de cabeceira foi de 2.5 Ma, tempo muito superior a divergência entre as linhagens estimada por nós.

A primeira cladogênese entre as linhagens de *S. hilarii* resulta na divergência entre as linhagens do São Francisco e Alto Paraná (nó 8, Fig. 4). O MRCA das linhagens provavelmente estava presente na bacia do Alto Paraná, quando, há 1.35 Ma (95% HPD 0.51 – 2.53 Ma), ocorreu um evento de geodispersão para a bacia do São Francisco. O processo de diversificação entre as linhagens simpátricas de *S. hilarii* (nó 9) não é claro. Elas poderiam ter vivenciado uma especiação simpátrica ou alopátrica dentro da bacia seguida por um contato secundário. Entretanto, esse cenário, indicado pela árvore de espécie, é diferente do que foi observado com os genes mitocondriais e por Machado et al. (no prelo): uma linhagem do São Francisco (denominada SF1 na análise ABC) é irmã do clado formado pelas linhagens do Alto rio Paraná e outra do rio São Francisco (SF2). Essa mudança nas relações entre as linhagens acarretaria em uma interpretação alternativa: o MRCA das linhagens de *S. hilarii* estaria presente na bacia do São Francisco (e não na bacia do Alto rio Paraná), quando houve uma captura de cabeceiras por parte do Alto rio Paraná. Essas duas populações acumularam diferenças e formaram duas linhagens: SF1 e (SF2+Alto Paraná). Um segundo evento de captura, agora por parte do Alto São Francisco, separou as linhagens SF2 e Alto rio Paraná. Essas especulações serão discutidas a seguir.

### ***Approximate Bayesian Computation* e teste de hipóteses biogeográficas**

Em geral, estudos filogeográficos da ictiofauna neotropical envolvem estimativas de tempos de divergências com a posterior correlação dos resultados com eventos geoclimáticos conhecidos, conforme realizado no tópico anterior. Entretanto, devido à complexidade de eventos envolvidos, padrões biogeográficos similares podem surgir de distintos processos de diversificação (Moritz et al., 2000). Por isso a importância de incorporar inferências estatísticas para testar hipóteses alternativas. Entre os poucos estudos utilizando essa abordagem em peixes de água doce da América do Sul, destacam-se a reconstrução de potenciais rotas de colonização histórica para a espécie *Aplochiton zebra* (Vanhaecke et al., 2015); a elucidação da performance dos distintos padrões de divergência gerados por marcadores nucleares e mitocondrial entre as linhagens de *Cichla temensis* (Willis et al., 2015); e a identificação dos eventos de geodispersão que promoveram a diversificação em peixes da família Pimelodidae no oeste amazônico (Tagliacollo et al., 2015). O nosso estudo é o primeiro a empregar abordagem bayesiana baseada em modelos para testar cenários biogeográficos alternativos potencialmente responsáveis pelo processo de diversificação de peixes dulcícolas Neotropicais.

As simulações das hipóteses biogeográficas suportaram o cenário de vicariância para as linhagens de *S. brasiliensis*, bem como entre *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia*, enquanto geodispersão foi o evento responsável pela diversificação nas linhagens de *S. hilarii*. O cenário escolhido para cada espécie apresentou o valor mais alto de probabilidade posterior sem sobreposição de intervalos de confiança com os demais cenários, correspondência entre estatísticas sumárias para os dados simulados e dado observado (resultado não mostrado), e baixas taxas de erro do tipo II para o cenário vencedor. Essas características indicam robustez na escolha do cenário (Cornuet et al., 2010). Apesar do erro do tipo I ter sido elevado, isto é, a probabilidade que os dados simulados sob um cenário vencedor serem incorretamente

atribuídos a outro cenário, isso não se configurou um problema. Segundo Bertorelle et al. (2010), as estimativas de erros precisam ser cautelosamente analisadas, pois não representam a estatística frequentista clássica. Isso significa que um único pseudodado simulado suporta o cenário, se a probabilidade posterior dele for maior que os demais. Portanto, estimativas de erros com baixos valores representam uma ferramenta poderosa para o suporte do cenário escolhido. Porém, quando são elevadas precisam ser associadas a informações adicionais que darão acurácia e poder à análise, como por exemplo, a não sobreposição entre os intervalos de confiança das probabilidades posteriores dos cenários (Bertorelle et al., 2010).

Apenas em *S. hilarii*, observamos parâmetros estimados com altos valores de RMAE: tamanho da população fundadora ( $N_{APf} - 0.835$ ) e tamanho populacional da linhagem 2 da bacia do rio São Francisco ( $N_{SF2} - 0.337$ ). Essa baixa precisão do parâmetro para a população fundadora ( $N_{APf}$ ) é comum em cenários com *bottlenecks* (Inoue et al., 2015). Cornuet et al. (2010) avaliaram que a qualidade das estimativas dos parâmetros pode ser melhorada substancialmente se marcadores apropriados e aumento de amostragem forem realizados. Por se tratar de parâmetros não utilizados no presente trabalho, esse resultado não afeta nossa avaliação sobre a distinção entre os eventos promotores de diversificação.

Tanto para *S. brasiliensis* quanto para *S. sp. Amazonas* e *S. sp. Araguaia* dois distintos cenários foram apresentados previamente como prováveis responsáveis por promoverem as suas diversificações. A análise ABC permitiu distinguir entre eles o mais provável. A reconstrução demográfica de *S. sp. Araguaia* e *S. sp. Amazonas* reforçou que o cenário de vicariância foi o processo que resultou na diversificação entre ambas. De acordo com as análises no DIYABC, uma população ancestral sofreu uma divisão há 2.36 Ma. Ao compararmos com os resultados do \*BEAST, observamos que essas estimativas de tempo de divergência são muito próximas e apresentam sobreposição em seus intervalos de confiança (2.7 Ma – Fig. 4 e Tabela 2). Portanto, a separação entre ambas está relacionada a um evento

vicariante que coincide temporalmente com o rompimento da conexão entre as paleobacias do Amazonas e Tocantins-Araguaia.

A espécie *S. brasiliensis* também apresentou o cenário de vicariância entre as linhagens do Alto Paraná e PUL como o mais provável promotor de diversificação entre elas. Segundo o cenário escolhido, a população ancestral sofreu uma quebra há aproximadamente 0.89 Ma, tempo próximo ao recuperado pela árvore de espécie (0.36 Ma – Fig. 4). Conforme discutido no tópico anterior, o evento vicariante foi o surgimento de Sete Quedas, que separou o Alto rio Paraná das demais bacias hidrográficas.

Por outro lado, para *S. hilarii* não havia dúvida com relação a qual evento gerou a diversificação das linhagens, o problema residia em como ocorreu esse evento. Na análise no DIYABC, o cenário mais provável revela o sistema hidrográfico do rio São Francisco como a bacia-fonte do evento de captura de cabeceira, e não o Alto rio Paraná, conforme observado na árvore de espécie (Fig. 4). Provavelmente, essa é a razão pela qual a probabilidade posterior do nó 9 não apresenta suporte adequado (0.90 – Fig. 4). O cenário reconstruído recuperou que parte da linhagem do São Francisco (SF1) geodispersou para a bacia do Alto rio Paraná há 1.95 Ma, tempo próximo à geodispersão calculada pelo \*BEAST entre as duas bacias (1.36 Ma, Fig. 4). Como o desenho dos cenários foi baseado na árvore de espécie, nós não empregamos o parafiletismo das linhagens do São Francisco, observado apenas em marcadores mitocondriais, para ser testado no DIYABC. O tempo de divergência entre as linhagens simpátricas foi o mesmo para as duas análises.

Diante dos resultados nós confirmamos que a abordagem ABC baseada em modelos pode ser particularmente informativa para estudos envolvendo testes de hipóteses biogeográficas para a ictiofauna dulcícola neotropical. Através desta análise, nós reconstruímos e fomos capazes de distinguir as assinaturas filogeográficas dos dois principais eventos, vicariância e geodispersão, promotores de diversificação de peixes neotropicais. A

hipótese hidrogeológica apresenta como assinatura um evento fundador na área colonizada, representando o evento de geodispersão. Ao contrário, a hipótese paleogeográfica não apresenta esse efeito fundador nem a identidade da bacia-fonte. Os resultados obtidos tanto pela filogeografia tradicional (estimativas de tempo de divergência associados a eventos históricos) quanto pela abordagem baseada em modelos foram similares. Isto sugere confiança e robustez do cenário biogeográfico responsável por modelar a atual estrutura filogeográfica de *S. brasiliensis*, *S. hilarii* e *S. sp. Araguaia* e *S. sp. Amazonas*. De maneira geral, os eventos de vicariância e geodispersão foram as responsáveis pela diversificação das espécies do gênero *Salminus*.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos especialmente a Dr. Jorge Ramirez, Universidade Federal de São Carlos, e Msc. Ivan Prates, City University of New York, pelas discussões proveitosas e conselhos na implementação do \*BEAST. Esta pesquisa foi subsidiada pelo Br-BOL (*Brazilian Barcode of Life*), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). A pesquisa está em concordância com as leis brasileiras, sendo aprovada pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA número 5765010416) e sob uma licença temporária de coleta com fins científicos de número 32217-4 providenciado por ICMBio-SISBIO.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, K.T., Mariguela, T.C., Avelino, G.S., Foresti, F., & Oliveira, C. (2014) Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican ichthyofauna. *BMC Evolutionary Biology*, **14**, 152.

Abell, R. et al. (2008) Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. *BioScience*, **58** (5): 403-414.

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 American Earth Sciences*, **21**, 14-27.

Albert, J.S., Petry, P. & Reis, R.E. (2011) Major Biogeographic and Phylogenetic Patterns. *Historical Biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. by J.S. Albert and R.E. Reis), pp. 21-17. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

Aljanabi, S.M. & Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, **25** (22), 4692-4693.

Antonelli, A. & Sanmartín, I. (2011) Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, **60** (2), 403-414.

Bartorelli, A. (2004) Origem da Grandes Cachoeiras do Planalto Basáltico da Bacia do Paraná: Evolução Quaternária e Geomorfologia. *Geologia do Continente Sul-Americano: Evolução da Obra de Fernando Flávio Marques de Almeida* (ed. by V. Mantesso-Neto, A. Bartorelli, C.D.R. Carneiro and B.B. Brito-Neves), pp. 95-111. Editora Beca Produções Culturais, São Paulo.

Beaumont, M.A. (2010) Approximate Bayesian Computation in Evolution and Ecology. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **41**, 379-406.

Beaumont, M.A., Zhang, W., Balding, D.J. (2002) Approximate Bayesian Computation in population genetics. *Genetics*, **162**, 2025-2035.

Beheregaray, L.B. (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, **17**, 3754-3774.

Bellafronte, E., Mariguela, T.C., Pereira, L.H.G., Oliveira, C. & Moreira-Filho, O. (2013) DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin – applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotropical Ichthyology*, **11** (3), 497-506.

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.

Bermond, G., Ciose, M., Lombart, E., Blin, A., Boriani, M., Furlan, L. & Toepfer, S. (2012) Secondary contact and admixture between independently invading populations of the western

corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* in Europe. *PLoS ONE*, **7** (11), e50129.

doi:10.1371/journal.pone.0050129

Bertorelle, G., Benazzo, A. & Mona, S. (2010) ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Molecular Ecology*, **19**, 2609-2625.

Buckup, P.A. (2011) The Eastern Brazilian Shield. *Historical Biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. by J.S. Albert and R.E. Reis), pp. 203-210. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

Burridge, C.P., Craw, D. & Waters, J.M. (2006) River capture, range expansion, and cladogenesis: the genetic signature of freshwater vicariance. *Evolution*, **60** (5), 1038-1049.

Castroviejo-Fisher, S., Guayasamin, J.M., Gonzalez-Voyer, A. & Vilá, C. (2014) Neotropical diversification seen through glassfrogs. *Journal of Biogeography*, **41** (1), 66-80.

Cione, A.L. & Azpelicueta, M.M. (2013) The first fossil species of *Salminus*, a conspicuous South American freshwater predatory fish (Teleostei, Characiformes), found in the Miocene of Argentina. *Journal of Vertebrate Paleontology*, **33** (5), 1051-1061.

Cornuet, J.M. Ravigné, A. & Estoup, A. (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *BMC Bioinformatics*, **11**, 401. doi: 10.1186/1471-2105-11-401

Cornuet, J.M., Santos, F., Beaumont, M.A., Robert, C.P., Marin, J.M., Balding, D.J., Guillemaud, T. & Estoup, A. (2008) Inferring population history with DIYABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics*, **24** (23), 2713-2719.

Cornuet, J.M., Pudlo, P., Veyssier, J., Dehne-Garcia, A. Gautier, M., Leblois, R., Marin, J.M. & Estoup, A. (2014) DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using Single Nucleotide Polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, **30** (8), 1187-1189.

Costello, A.B., Down, T.E., Pollard, S.M., Pacas, C.J., & Taylor, E.B. (2003) The influence of history and contemporary stream hydrology on the evolution of genetic diversity within species: an examination of microsatellite DNA variation in bull trout, *Salvelinus confluentus* (Pisces: Salmonidae). *Evolution*, **57** (2), 328-344.

Dávalos, L.M., Cirranello, A.L., Geisler, J.H. & Simmons, N.B. (2012) Understanding phylogenetic incongruence: lessons from phyllostomid bats. *Biological Reviews*, **87**, 991-1024.

de Godoy, M.P. (1975) *Peixes do Brasil, subordem Characoidei, Bacia do Rio Mogi Guassu*. Primeira edição. Editora Franciscana. Brazil. Vol II: 217-398p.

Dmitriev, D.A. & Rakitov, R.A. (2008) Decoding of superimposed traces produced by direct sequencing of heterozygous indels. *PLoS Computational Biology*, **4** (7), e1000113. doi:10.1371/journal.pcbi.1000113

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology and Evolution*, **29**,1969-1973.

Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C. (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics*, **10** (3), 315-319.

Flot, J-F. (2010) SeqPHASE: a web tool for interconverting PHASE input/output files and FASTA sequence alignments. *Molecular Ecology Resource*, **10**, 162-166.

Funk, D.J. & Omland, K.E. (2003) Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **34**, 397–423.

Hrbek, T., da Silva, V.M.F., Dutra, N., Gravena, W., Martin, A. R. & Farias, I. P. (2014) A New species of river dolphin from brazil or: How little do we know our biodiversity. *PLoS ONE*, **9** (1), e83623. doi:10.1371/journal.pone.0083623

Ho, S.Y.W., Tong, K.J., Foster, C.S.P., Ritchie, A.M., Lo, N. & Crisp, M.D. (2015) Biogeographic calibrations for the molecular clock. *Biology Letters*, **11**, doi: 10.1098/rsbl.2015.0194

Horn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G.A. & Lorente, M.A. (1995) Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology*, **23**, 237 – 240.

Hoorn, C., Wesseling, F.P., ter Steege, H., Bermudez, M.A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Shancez-Meseguer, A., Anderson, C.L., Figueredo, J.P., Jaramillo, C., Riff, D., Negri, F.R., Hooghiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Särkinen, T. & Antonelli, A. (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, **330**, 927-931.

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.

Inoue, K., Lang, B.K., & Berg, D.J. (2015) Past climate change drives current genetic structure of an endangered freshwater mussel species. *Molecular ecology*, **24** (8), 1910-1926.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. & Drummond, A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, **28** (12), 1647-1649.

Kodandaramaiah, U. (2010) Use of dispersal-vicariance analysis in biogeography – a critique. *Journal of Biogeography*, **37**, 3-11.

Kusukawa, N., Uemori, T., Asada, K. & Kato, I. (1990) Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, **9**, 66-72.

Landis, M., Matzke, N.J., Moore, B.R. & Huelsenbeck, J.P. (2013) Bayesian analysis of biogeography when the number of areas is large. *Systematic Biology*, **62**, 789-804.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y. & Guindon, S. (2012) PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 1695–1701.

Leite, R.F. & Rogers, D.S. (2013) Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms, Diversity & Evolution*, doi: 10.1007/s13127-013-0140-8

Lima, F.C.T. (2006) *Revisão taxonômica e relações filogenéticas do gênero Salminus (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae)*. (Unpublished doctoral dissertation). Universidade de São Paulo, São Paulo.

Lima, F.C.T.; Britski, H. A. (2007) *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, **5** (3), 237–244.

Lima, F.C.T. & Caires, R. A. (2011) Fishes from the Serra Geral do Tocantins Ecological Station, Rio Tocantins and Rio São Francisco basins, with remarks on the biogeographical

implications of the common headwater between the Rio Sapão and Rio Galheiros. *Biota Neotropica*. **11** (1),

<http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1/en/abstract?article+bn03411012011>.

Lima, F.C.T. & Ribeiro, A.C. (2011) Continental-Scale Tectonic Controls of Biogeography and Ecology. *Historical Biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. by J.S. Albert and R.E. Reis), pp. 145-164. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

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. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (ed. by L.R. Malabarba, R. E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena and C.A.S. Lucena), pp. 13-48. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs.

Menezes, N.A., Ribeiro, A.C., Weitzman, S. & Torres, R.A. (2008) Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. *Zootaxa*, **1726**, 33-48.

Machado, C.B., Ishizuka, T.K., Freitas, P.D., Valiati, V.H. & Galetti Jr., P.M. DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characidae). *Systematics and Biodiversity*, no prelo.

Martin, D. & Rybicki, E. (2000) RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, **16**, 562-563.

Matzke, N.J. (2013) Probabilistic historical biogeography: new models for founder event speciation, imperfect detection, and fossils allow improved accuracy and model-testing. *Frontier of Biogeography*, **5**, 242–248.

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

Moritz, C., Patton, J.L., Schneider, C. J. & Smith, T.B. (2000) Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**, 533-563.

Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguela, T. C., Benine, R. C., Ortí, G., Vari, R. P. & Castro, R. M. C. (2011) Phylogenetic relationships within the speciose Family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 275.

Ortí, G. & Meyer, A. (1997) The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, **46** (1), 75-100.

Piálek, L., Říčan, O., Casciotta, J., Almirón, A., & Zrzavý, J. (2012) Multilocus phylogeny of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae), with biogeography of the *C. lacustris* group: species flocks as a model for sympatric speciation in rivers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **62** (1), 46-61.

Posada, D. (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253-1256.

Potter, P.E. (1997) The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: A natural history. *Journal of South American Earth Sciences*, **10** (5–6), 331–344.

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

Ree, R.H. (2005) Detecting the historical signature of key innovations using stochastic models of character evolution and cladogenesis. *Evolution*, **59**, 257–265.

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** (2), 225–246.

Ribeiro, A.C. & Menezes, N.A. (2015) Phylogenetic relationship of the species and biogeography of the characid genus *Oligosarcus* Günther, 1864 (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Zootaxa*, **3949** (1), 041–081.

Rull, V. (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, **26** (10), 508-513.

Ronquist, F. (1997) Dispersal-Vicariance Analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology*, **46**, 195–203.

Rossetti, D.F. & Valeriano, M.M. (2007) Evolution of the lowest amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. *Catena*, **70**, 253-265.

Saadi, A. (1993) Neotectônica da Plataforma Brasileira: esboço e interpretação preliminares. *Geonomos*, **1** (1), 1-15.

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.

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

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

Tagliacollo, V.A., Roxo, F.F., Duke-Sylvester, S.M., Oliveira, C. & Albert, J.S. (2015) Biogeographical signature of river capture events in Amazonian lowlands. *Journal of Biogeography*, doi:10.1111/jbi.12594

Thomaz, A.T., Malabarba, L.R., Bonatto, S.L. & Knowles, L.L. (2015) Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian Coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, doi:10.1111/jbi.12597

Vanhaecke, D., Garcia de Leaniz, C., Gajardo, G., Dunham, J., Giannico, G., & Consuegra, S. (2015) Genetic signatures of historical dispersal of fish threatened by biological invasions: the case of galaxiids in South America. *Journal of Biogeography*, **42** (10), 1942-1952.

Villela, F.N.J. & Nogueira, C. (2011) Geologia e geomorfologia da estação ecológica Serra Geral do Tocantins. *Biota Neotropica*, **11** (1), 217-229.

Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L. & Wang, Y. (2003) An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **26**, 1-7.

Yu, Y., Harris, A.J., Blair, C. & He, X. (2013) RASP (Reconstruction Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **87**, 46-49.

Wagenmakers, E.J. & Farrel, S. (2004) AIC model selection using Akaike weights. *Psychonomic Bulletin & Review*, **11** (1), 192-196.

Weir, J.T. (2006) Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and highland neotropical birds. *Evolution*, **60** (4), 842-855.

Willis, S.C., Winemiller, K.O., Montaña, C.G., Macrander, J., Reiss, P., Farias, I.P. & Ortí, G. (2015) Population genetics of the speckled peacock bass (*Cichla temensis*), South America's most important inland sport fishery. *Conservation Genetics*, **16**, 1345-1357.

*Biosketch:* Carolina Machado está desenvolvendo seu Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, na Universidade Federal de São Carlos, Brasil. Atualmente, direciona seus estudos na filogenia e filogeografia de peixes neotropicais dulcícolas, com o objetivo de conhecer os processos históricos e/ou ecológicos responsáveis pelo atual padrão de distribuição da ictiofauna sul-americana. Ana Carnaval é professora assistente da City University of New York e pesquisadora associada do American Museum of Natural History, em Nova Iorque, EUA. Desenvolve pesquisas relacionadas aos processos evolutivos e ecológicos responsáveis pela origem e manutenção da biodiversidade, com o objetivo de melhorar a predição e conservação da região Tropical. Pedro Galetti é professor titular da Universidade Federal de São Carlos, Brasil. Sua pesquisa está focada na genética da conservação, envolvendo animais aquáticos e terrestres. Estudos relacionados à genética forense, sistemática, taxonomia, filogenia e filogeografia também fazem parte do seu escopo de pesquisa.

Contribuição dos autores: C. B. M. S., A. C. C. e P. M. G. J. concebeu as ideias; C. B. M. S. coletou e analisou os dados; C. B. M. S. liderou a escrita; e, A. C. C. e P. M. G. J. revisou o manuscrito.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1- Probabilidades posteriores de cada cenário estimada usando DIYABC. A maior probabilidade está em negrito.

	Probabilidade posterior (95% HPD)	Cenário vencedor
<i>Salminus brasiliensis</i>		
Cenário 1- Bacias do Alto Paraná e PUL divergem da população ancestral (vicariância)	<b>0.4642 (0.4420-0.4865)</b>	<p>Phylogenetic tree for <i>Salminus brasiliensis</i> showing a split from Na into N<sub>AP</sub> (Alto Paraná) and N<sub>PUL</sub> (PUL).</p>
Cenário 2- Bacia PUL* captura parte da bacia do Alto Paraná (geodispersão)	0.3104 (0.2895-0.3313)	
Cenário 3- Alto Paraná captura parte do PUL (geodispersão)	0.2254 (0.2060-0.2448)	
<i>Salminus</i> sp. Amazonas e <i>Salminus</i> sp. Araguaia		
Cenário 1- Vicariância	<b>0.4875 (0.4475-0.5274)</b>	<p>Phylogenetic tree for <i>Salminus</i> sp. Amazonas and Araguaia showing a split from Na into N<sub>Am</sub> (Amazonas) and N<sub>ToA</sub> (Araguaia).</p>
Cenário 2- Bacia Tocantins-Araguaia captura parte da bacia Amazonas (geodispersão)	0.2050 (0.1736-0.2364)	
Cenário 3- Bacia Amazonas captura parte da bacia Tocantins-Araguaia (geodispersão)	0.3075 (0.2695-0.3456)	
<i>Salminus hilarii</i>		
Round 2		
Cenário 1 - Bacias Alto Paraná e São Francisco (SF2) divergem da população ancestral (vicariância)	0.1366 (0.0606-0.2126)	<p>Phylogenetic tree for <i>Salminus hilarii</i> Round 2 showing a split from Na into N<sub>SF1</sub> (São Francisco) and N<sub>SF2</sub> (São Francisco), with N<sub>SF2</sub> further splitting into N<sub>SF2</sub> and N<sub>AP</sub> (Alto Paraná).</p>
Cenário 2 - Bacia Alto Paraná captura parte da Bacia São Francisco (SF1) (geodispersão)	<b>0.8312 (0.7386-0.9239)</b>	
Cenário 3 - Bacia São Francisco (SF2) captura parte da bacia Alto Paraná (geodispersão)	0.0321 (0.0000-0.4841)	

\*PUL: Sigla que designa as bacias Paraguai, Uruguai e Lagoa dos Patos.

Tabela 2 – Valores posteriores dos parâmetros para os cenários com alta probabilidade (Vencedores). A unidade de tempo, contada em geração, foi convertida em  $10^6$  anos antes do presente (Ma), baseada na média do tempo de geração de 2 anos (De Godoy 1975).

	Parâmetros	Estimativa posterior dos parâmetros		
		Mediana	95% HPD	RMAE
<i>Salminus brasiliensis</i>				
Tamanho efetivo da linhagem PUL	$N_{PUL}$	136000	61400-332000	0.265
Tamanho efetivo da linhagem Alto Paraná	$N_{AP}$	85300	37900-214000	0.247
Tamanho efetivo da população ancestral	$N_a$	685000	269000-970000	0.119
Tempo de divergência entre as linhagens PUL e Alto Paraná	$t_3$	0.892 Ma	0.416-1.17 Ma	0.269
<i>Salminus</i> sp. Amazonas e <i>Salminus</i> sp. Araguaia				
Tamanho efetivo da espécie Araguaia	$N_{ToA}$	30100	12300-115000	0.288
Tamanho efetivo da espécie Amazonas	$N_{Am}$	155000	57800-442000	0.279
Tamanho efetivo da população ancestral	$N_a$	582000	204000-956000	0.136
Tempo de divergência entre as espécies Araguaia e Amazonas	$t_3$	2.36 Ma	1.178-4.54 Ma	0.190
<i>Salminus hilarii</i>				
Tamanho efetivo da linhagem São Francisco (SF1)	$N_{SF1}$	446000	156000-882000	0.267
Tamanho efetivo da linhagem São Francisco (SF2)	$N_{SF2}$	441000	135000-907000	0.337
Tamanho efetivo da linhagem Alto Paraná	$N_{AP}$	460000	179000-832000	0.254
Tamanho efetivo da população fundadora do Alto Paraná	$N_{APf}$	5040	358-9740	0.835
Tempo de divergência entre as linhagens São Francisco (SF1) e São Francisco (SF2)	$t_s$	0.606 Ma	0.216-1.086 Ma	0.272
Tempo de expansão da população após o evento fundador	$t_1$	1.592 Ma	0.77-2.58 Ma	0.255
Tempo do evento fundador entre as linhagens do São Francisco e Alto Paraná	$t_3$	1.952 Ma	1.046-3.24 Ma	0.135

RMAE: média relativa do erro absoluto.

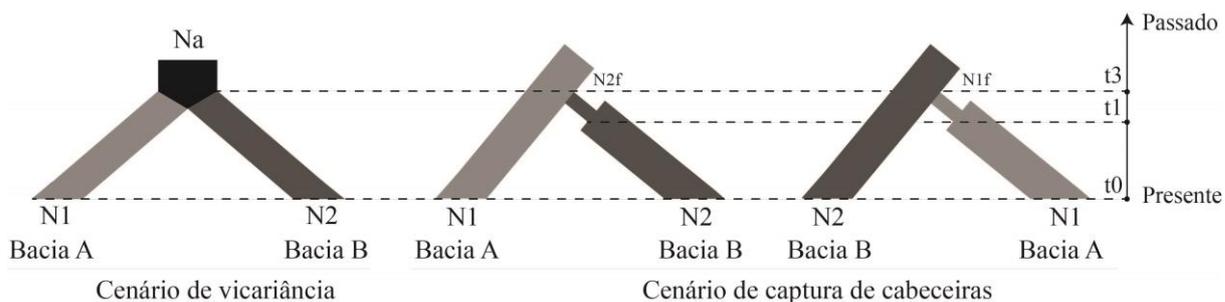


Figura 1. Reconstrução dos cenários evolutivos para testar as hipóteses Paleogeográfica e Hidrogeológica. (1) Hipótese Paleogeográfica apresenta uma assinatura de vicariância. Neste cenário, nós assumimos uma população ancestral, com tamanho efetivo  $N_a$ , que no tempo  $t_3$  sofre uma divisão e duas novas populações são formadas com tamanho efetivo menor que o  $N_a$  ( $N_1$  e  $N_2$ ). (2) Hipótese Hidrogeológica tem uma assinatura de geodispersão. Nós assumimos um pequeno número de fundadores ( $N_{1f}$  ou  $N_{2f}$ , onde “f” significa fundador), originado a partir de uma bacia-fonte, que coloniza uma bacia adjacente após o evento de captura em  $t_3$ , seguida por uma expansão populacional em  $t_1$ .



Figura 2. Locais de coleta de *Salminus*. *Salminus affinis* (◆), *Salminus brasiliensis* (■), *Salminus franciscanus* (★), *Salminus hilarii* (▲), *Salminus* sp. Amazonas (●) e *Salminus* sp. Araguaia (✦).

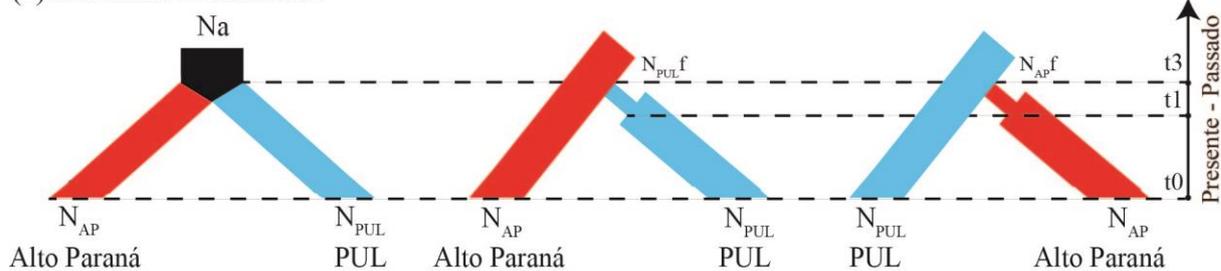
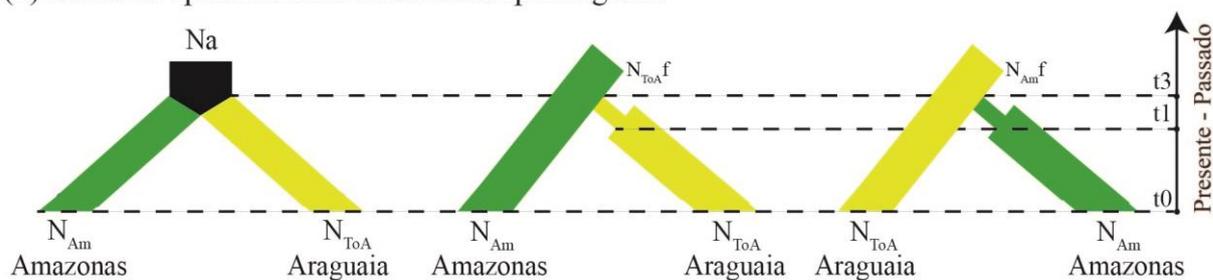
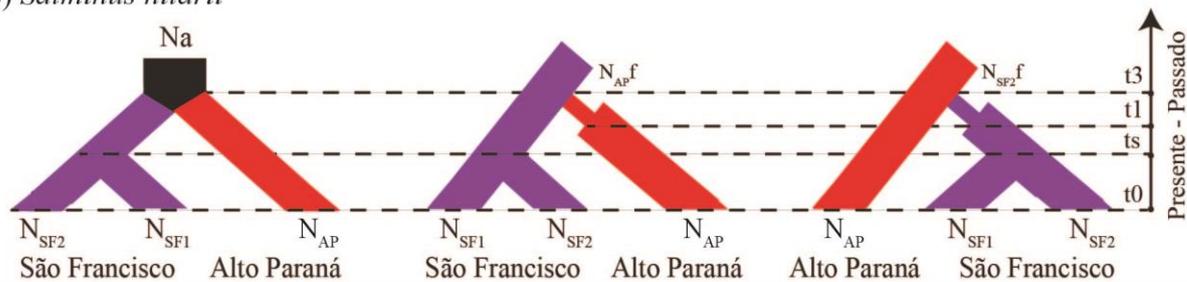
(a) *Salminus brasiliensis*(b) *Salminus* sp. Amazonas e *Salminus* sp. Araguaia(c) *Salminus hilarii*

Figura 3. Cenários evolutivos testados através da análise ABC no DIYABC. Em (a) *S. brasiliensis*, (b) *S. sp. Araguaia* e *S. sp. Amazonas* e (c) *S. hilarii*. Cores representam as bacias hidrográficas onde as amostras foram coletadas (Fig. 2).

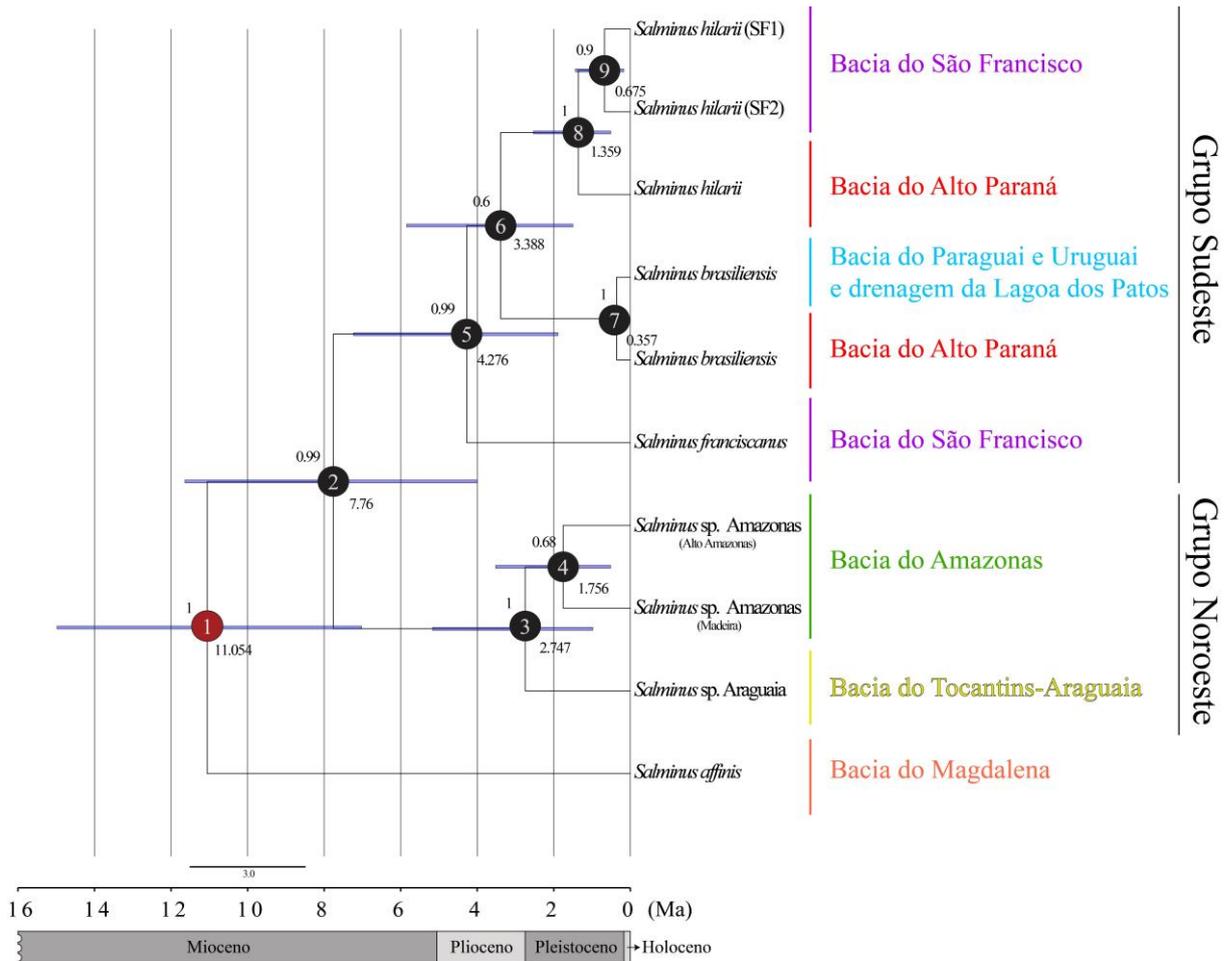


Figura 4. Análise filogenética bayesiana e estimativa de tempo de divergência no BEAST v1.8.1 empregando dois marcadores mitocondriais (COI e CytB) e dois nucleares (RAG2 e S7). Nós usamos um evento biogeográfico para a calibração da topologia (círculo vermelho). Números abaixo dos nós representam as estimativas de tempo de divergência, enquanto os números acima representam a probabilidade posterior. Barras azuis representam 95% HPD dos tempos estimados.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

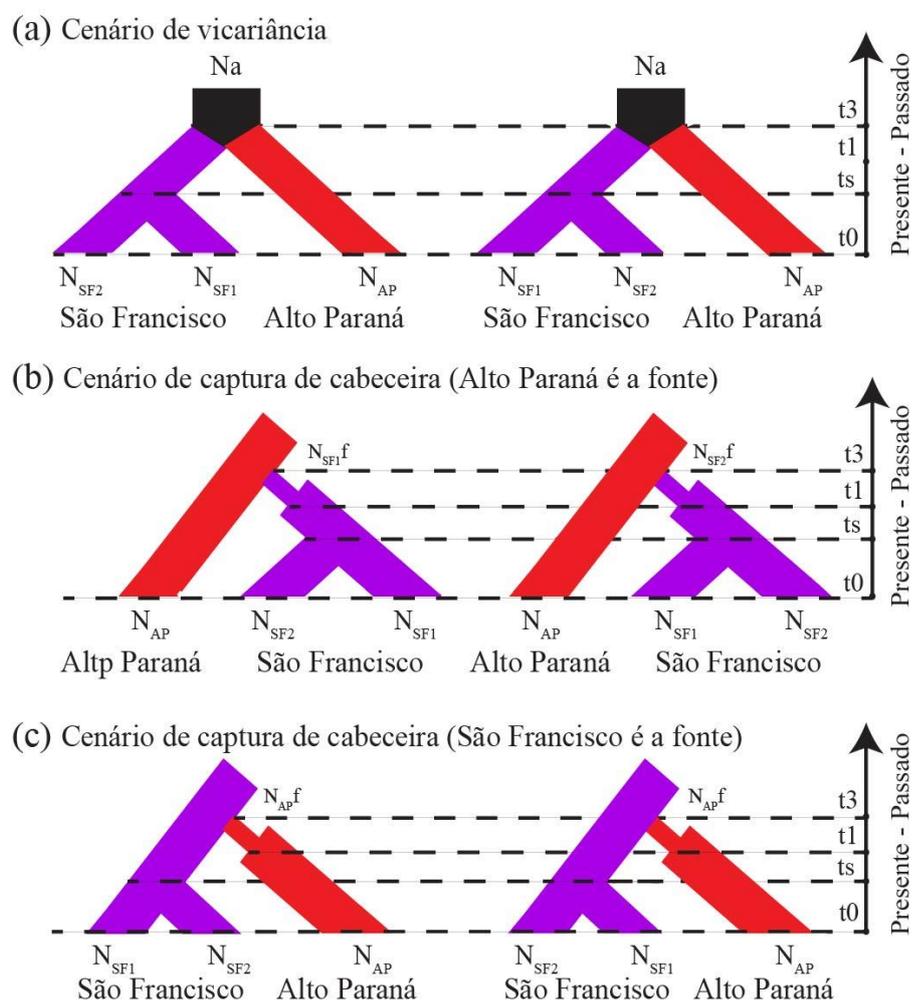
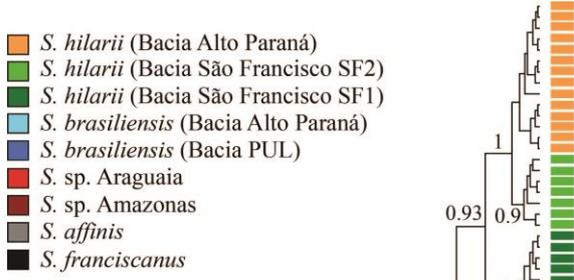
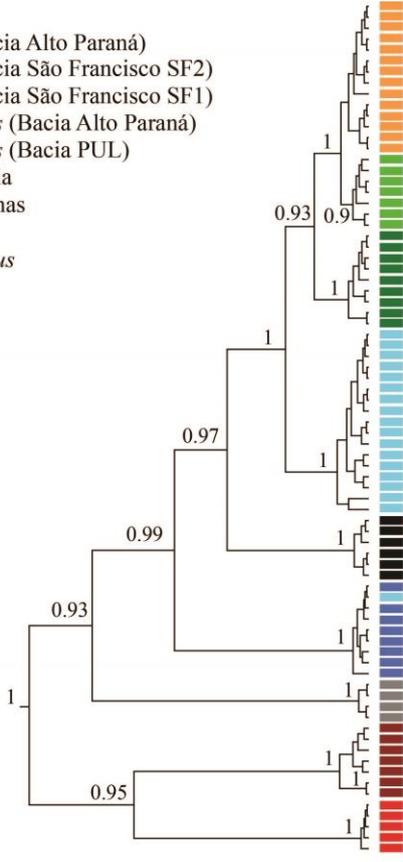


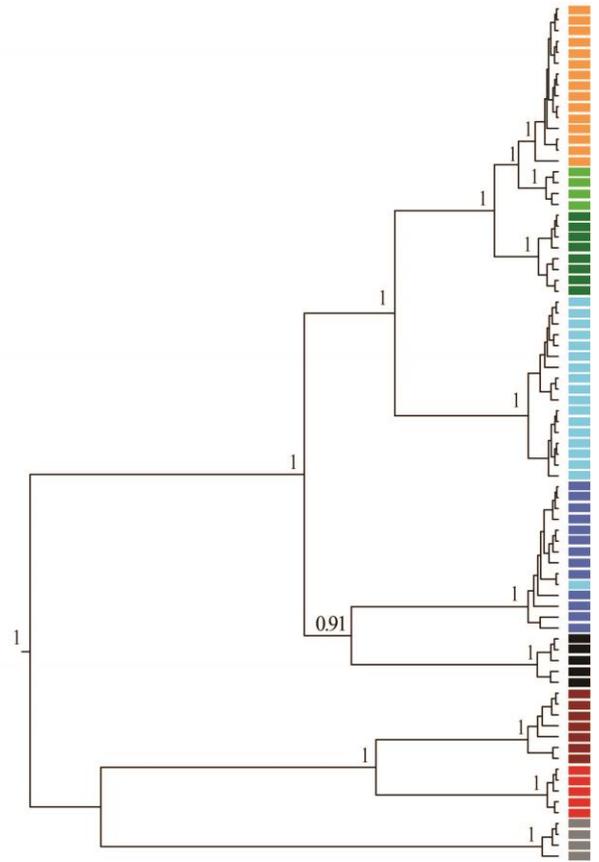
Figura S1. Primeira rodada dos cenários evolutivos testados para *S. hilarii* usando o DIYABC. (a) cenário de vicariância, (b) cenário de geodispersão com o Alto rio Paraná como bacia-fonte, e (c) geodispersão de cabeceira com o rio São Francisco como bacia-fonte.



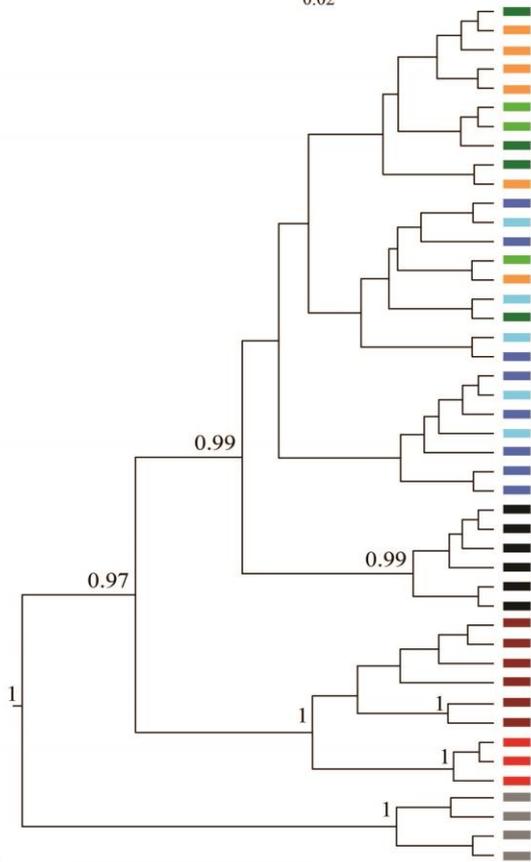
a



b



c



d

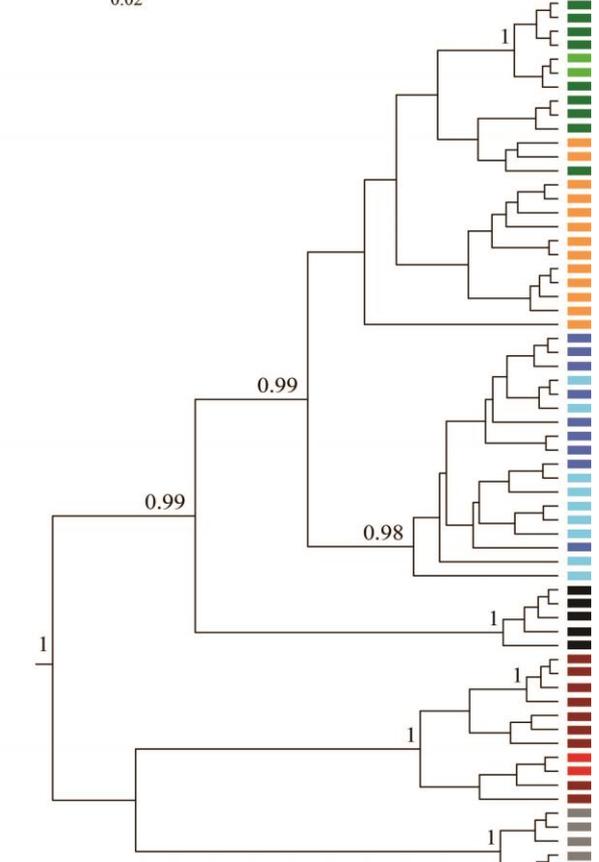


Figura S2: Filogenias gênicas recuperadas através da análise bayesiana, realizadas no BEAST, para o gênero *Salminus*. (a) COI; (b) Cytb; (c) RAG2 e (d) íntron S7. A barra de escala representa a estimativa de substituição por sítio. Números acima dos nós indicam as probabilidades posteriores (>0.90). O grupo externo foi retirado da ilustração.

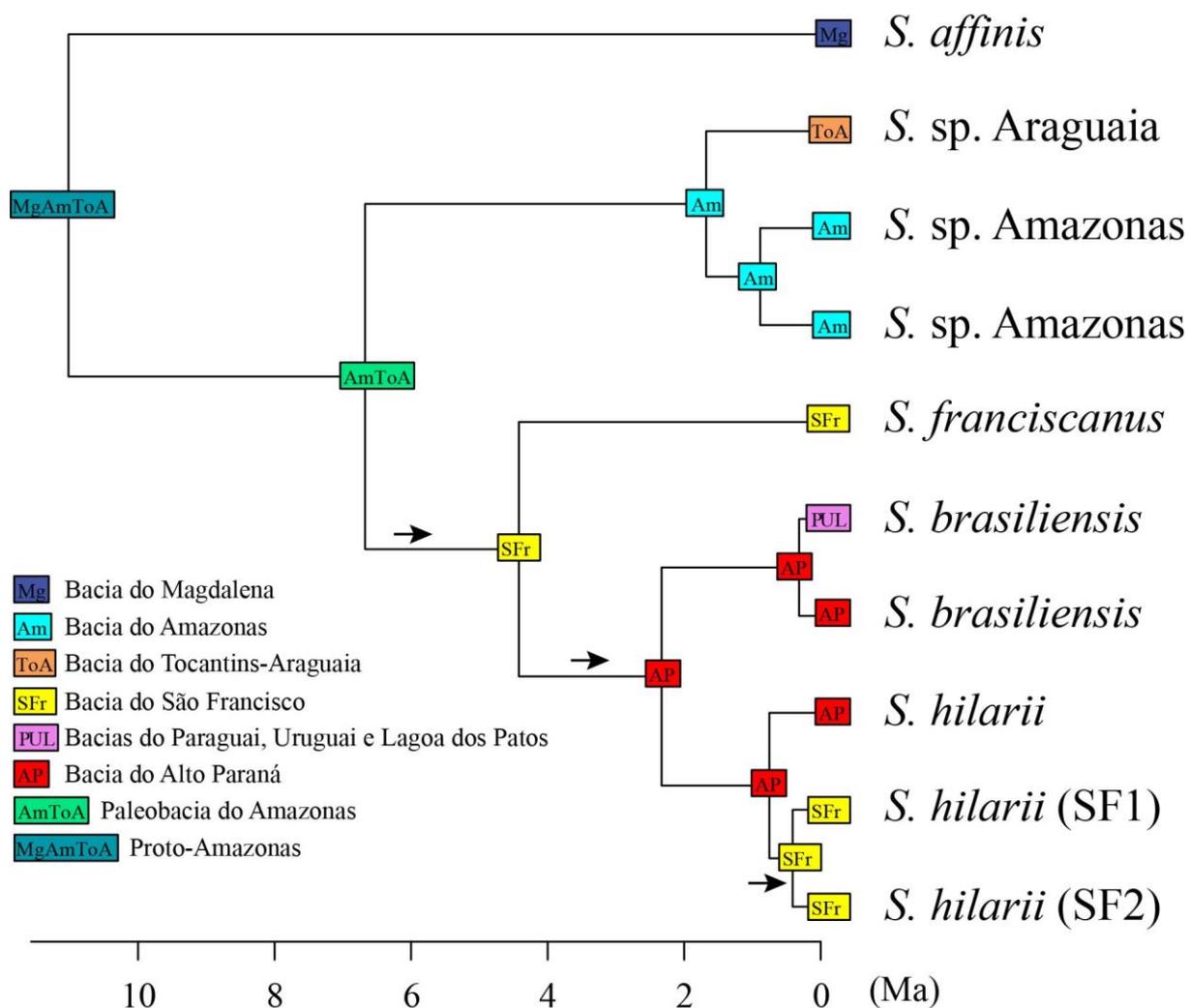


Figura S3: Estimativa de áreas ancestrais para as espécies de *Salminus* de acordo com o modelo biogeográfico mais provável (DIVALIKEj) calculado a partir do BioGeoBEARS. As setas indicam prováveis eventos de geodispersão, hipotetizados a partir da correlação com dados geológicos conhecidos.

Tabela S1: Locais de coleta de *Salminus* na América do Sul e número de acesso do Genbank.

Espécie/ Amostra	Rio	Bacia hidrográfica	País	Latitude	Longitude	Número de acesso do Genbank				
						COI	Cytb	D-loop	RAG2	S7
<i>Salminus affinis</i>										
SA_005	Magdalena	Magdalena	Colômbia	2.99246	-75.273	X	X	X	KT619160	X
SA_008	Magdalena	Magdalena	Colômbia	2.99246	-75.273	X	-	-	-	X
SA_009	Magdalena	Magdalena	Colômbia	2.99246	-75.273	X	X	X	KP342002	X
SA_019	Magdalena	Magdalena	Colômbia	2.99246	-75.273	X	X	X	X	X
SA_020	Magdalena	Magdalena	Colômbia	2.99246	-75.273	X	-	-	-	X
SA_021	Magdalena	Magdalena	Colômbia	2.99246	-75.273	X	-	X	X	X
<i>Salminus brasiliensis</i>										
SB_016	Miranda	Paraguai	Brasil	-19.43627	-57.309438	-	X	X	-	-
SB_069*	Cuiabá	Paraguai	Brasil	-15.2803	-56.281604	-	X	X	X	-
SB_174*	Jaurú	Paraguai	Brasil	-16.33011	-57.7995	X	X	X	X	X
SB_199*	Paraguai	Paraguai	Brasil	-15.078930	-57.179498	X	-	-	KP342003	-
SB_208	Paraguai	Paraguai	Brasil	-15.0789	-57.1795	-	X	X	-	-
SB_263*	Mogi-Guaçu	Alto rio Paraná	Brasil	-21.9237	-47.35237	X	X	X	X	X
SB_284	Mogi-Guaçu	Alto rio Paraná	Brasil	-21.9237	-47.35237	X	X	X	-	-
SB_294*	Mogi-Guaçu	Alto rio Paraná	Brasil	-21.9263	-47.37149	X	X	X	-	X
SB_326*	Caí	Lagoa dos Patos	Brasil	-29.6618	-51.41553	X	X	X	X	-
SB_329*	Jacuí	Lagoa dos Patos	Brasil	-30.0239	-51.25348	-	X	X	-	X
SB_339*	Ibicuí da Amada	Uruguai	Brasil	-30.4196	-54.95046	X	X	X	KP342004	X
SB_356*	Turvo	Alto rio Paraná	Brasil	-20.1779	-49.62139	X	X	X	-	X
SB_371*	Grande	Alto rio Paraná	Brasil	-20.1274	-48.57503	X	X	X	-	X
SB_372*	Grande	Alto rio Paraná	Brasil	-20.4245	-49.25973	X	X	X	X	X
SB_373	Turvo	Alto rio Paraná	Brasil	-20.4232	-49.25562	X	X	X	-	-
SB_378	Tiête	Alto rio Paraná	Brasil	-22.5138	-48.57503	X	X	X	-	-

SB_396	Jacaré-Pepira	Alto rio Paraná	Brasil	-22.075044	-48.480097	KF731762	X	X	-	-
SB_409	Paranapanema	Alto rio Paraná	Brasil	-22.9333	-50.25	X	X	X	-	-
SB_426*	Paranapanema	Alto rio Paraná	Brasil	-22.9333	-50.25	X	X	X	-	X
SB_436*	Paranapanema	Alto rio Paraná	Brasil	-22.9333	-50.51667	X	X	X	-	X
SB_437*	Tietê	Alto rio Paraná	Brasil	-22.49833333	-48.56131667	KF731763	X	X	KP342005	X
SB_458	Paranapanema	Alto rio Paraná	Brasil	-22.9333	-50.25	X	X	X	-	-
SB_498*	Paraná	Alto rio Paraná	Brasil	-23.36975833	-53.76455556	X	X	X	-	X
SB_517	Paraná	Alto rio Paraná	Brasil	-23.36975833	-53.76455556	X	X	X	-	-
SB_537	Paraná	Alto rio Paraná	Brasil	-23.36975833	-53.76455556	X	X	X	-	-
SB_571*	Sepotuba	Paraguai	Brasil	-14.80781389	-57.77916667	X	X	X	KP342006	X
SB_574	Paraná	Alto rio Paraná	Brasil	-25.424547	-54.597244	-	-	-	X	-
SB_576*	Uruguai	Uruguai	Brasil	-27.28353056	-52.39229167	-	X	X	X	X
SB_577*	Piracicaba	Alto Paraná	Brasil	-22.72722222	-47.65760278	X	X	X	KP342007	-
SB_P70*	Uruguai	Uruguai	Brasil	-27.167725	-53.83527778	X	X	X	X	X
SB_T123	Uruguai	Uruguai	Brasil	-27.26393333	-54.05471389	X	X	X	-	-
SB_Y2*	Uruguai	Uruguai	Brasil	-27.14252222	-53.88426667	X	X	X	KP342008	X
SB_Y4*	Uruguai	Uruguai	Brasil	-27.14252222	-53.88426667	X	X	X	-	X
SB_Y8*	Uruguai	Uruguai	Brasil	-27.14252222	-53.88426667	X	X	X	-	X
SB_L08*	Ligeiro	Uruguai	Brasil	-27.51666667	-51.83333333	KF731765	-	-	-	X
SB_L10*	Ligeiro	Uruguai	Brasil	-27.51666667	-51.83333333	KF731766	-	-	-	X
SB_L27	Ligeiro	Uruguai	Brasil	-27.51666667	-51.83333333	-	-	-	-	X
SB_L40	Ligeiro	Uruguai	Brasil	-27.51666667	-51.83333333	KF731768	-	-	-	X
<i>Salminus franciscanus</i>										
SF_005	São Francisco	São Francisco	Brasil	-18.3377	-45.283644	KF731771	X	X	X	X
SF_007	São Francisco	São Francisco	Brasil	-18.3377	-45.283644	KF731772	X	-	X	X
SF_016	São Francisco	São Francisco	Brasil	-18.3377	-45.283644	X	X	X	KP342009	X
SF_035	São Francisco	São Francisco	Brasil	-17.3607	-44.9507	X	X	X	KP342010	X
SF_104	São Francisco	São Francisco	Brasil	-17.1479	-45.860186	X	X	X	X	-
SF_116	São Francisco	São Francisco	Brasil	-13.2974	-43.907869	X	X	X	X	X
<i>Salminus hilarii</i>										

SH_002*	São Francisco	São Francisco	Brasil	-20.348	-46.068	X	X	X	KP342011	X
SH_003*	São Francisco	São Francisco	Brasil	-20.348	-46.068	X	X	X	KP342012	X
SH_004*	São Francisco	São Francisco	Brasil	-20.348	-46.068	X	X	X	X	X
SH_007	São Francisco	São Francisco	Brasil	-20.348	-46.068	X	-	-	-	-
SH_008*	São Francisco	São Francisco	Brasil	-20.348	-46.068	X	X	X	KP342013	X
SH_009*	Peixe	São Francisco	Brasil	-20.199	-46.249	X	X	X	KT619161	-
SH_010*	Samburá	São Francisco	Brasil	-20.18516667	-46.25136667	X	X	X	X	-
SH_018*	Samburá	São Francisco	Brasil	-20.084530,	-46.345012	X	-	X	-	X
SH_022*	Peixe	São Francisco	Brasil	-20.199	-46.249	X	X	X	X	X
SH_025	Peixe	São Francisco	Brasil	-20.199	-46.249	X	X	X	-	-
SH_026	Peixe	São Francisco	Brasil	-20.199	-46.249	X	-	-	-	-
SH_042	Samburá	São Francisco	Brasil	-20.084530	-46.345015	X	X	X	-	X
SH_045*	São Francisco	São Francisco	Brasil			X	X	X	-	X
SH_051	Piumhi	São Francisco	Brasil	-20.342	-45.986	X	X	X	-	-
SH_054	Piumhi	São Francisco	Brasil	-20.342	-45.986	X	X	X	-	-
SH_061*	Mogi-Guaçu	Alto rio Paraná	Brasil	-21.088547	-48.182651	X	X	X	X	X
SH_068	Turvo	Alto rio Paraná	Brasil	-20.37755556	-49.27744444	X	X	X	-	-
SH_069	Turvo	Alto rio Paraná	Brasil	-20.37755556	-49.27744444	X	X	X	-	-
SH_070	Cachoeirinha	Alto rio Paraná	Brasil	-20.598	-49.12	X	X	X	-	-
SH_074*	Ponte Nova	Alto rio Paraná	Brasil	-20.598	-49.12	X	X	X	KP342014	X
SH_076*	Ponte Nova	Alto rio Paraná	Brasil	-20.598	-49.12	X	X	X	X	-
SH_078	Ponte Nova	Alto rio Paraná	Brasil	-20.598	-49.12	X	X	X	-	-
SH_079*	Turvo	Alto rio Paraná	Brasil	-20.18066667	-49.63388889	X	X	X	-	X
SH_082*	Turvo	Alto rio Paraná	Brasil	-20.418583	-49.267122	X	X	X	X	X
SH_088	Cubatão	Alto rio Paraná	Brasil	-21.146	-49.339	X	X	X	-	X
SH_091	Cubatão	Alto rio Paraná	Brasil	-21.146	-49.339	X	X	X	-	-
SH_095	Jacaré-Pepira	Alto rio Paraná	Brasil	-22.265	-48.229	KF731773	X	X	-	X
SH_100	Jacaré-Pepira	Alto rio Paraná	Brasil	-22.265	-48.229	KF731774	X	-	-	-
SH_104*	Quebra-Anzol	Alto rio Paraná	Brasil	-19.428	-46.585	X	X	X	-	X
SH_118*	Batalha	Alto rio Paraná	Brasil	-22.045	-49.249	X	X	X	KP342015	X
SH_151*	Carmo	Alto rio Paraná	Brasil	-20.165	-47.879	X	-	X	-	X

SH_160*	Lagoa de Inhuma	São Francisco	Brasil	-20.203	-45.874	X	X	X	KT619162	X
<i>Salminus</i> sp. Amazonas										
SI_015*	Madeira	Amazonas	Brasil	-8.8031	-63.962	X	X	X	KP342018	X
SI_017*	Madeira	Amazonas	Brasil	-9.2522	-64.635	X	X	X	KP342019	X
SI_019*	Orteguaza	Amazonas	Colômbia	1.53963	-75.529	X	X	X	X	X
SI_020*	Orteguaza	Amazonas	Colômbia	1.53963	-75.529	X	X	X	KP342020	X
SI_024*	Amazonas	Amazonas	Peru	-3.765	-73.246	X	X	X	KP342021	X
SI_025*	Amazonas	Amazonas	Peru	-3.765	-73.246	X	X	X	-	X
SI_026*	Amazonas	Amazonas	Peru	-3.765	-73.246	X	X	X	KP342022	X
<i>Salminus</i> sp. Araguaia										
SI_002*	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Brasil	-15.88368611	-52.10670556	X	X	X	KP342016	-
SI_005*	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Brasil	-15.88368611	-52.10670556	X	X	X	-	X
SI_010*	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Brasil	-15.88368611	-52.10670556	X	X	X	KP342017	X
SI_012*	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Brasil	-15.88368611	-52.10670556	X	X	X	-	-
SI_014*	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Brasil	-15.88368611	-52.10670556	X	X	X	X	X
<i>Brycon</i> sp.										
B_15	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Brasil	-15.88368611	-52.10670556	X	X	X	X	X
B_16	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Brasil	-15.88368611	-52.10670556	X	X	X	-	-

\*Espécimes empregados na análise DIYABC

X: representam as sequências que ainda necessitam ser submetidas ao Genbank

Tabela S2: Sequências dos *primers* empregados neste estudo e a temperatura de anelamento utilizada na PCR.

Marcador	Nome do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i>	Referência	Temperatura de anelamento
COI	FISHF1	5'- TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC - 3'	Ward et al. 2005	52°C
	FISHR1	5'- TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA - 3'		
CytB	AnosCytBF	5'- AAYATCTCYGCATGATGAAA - 3'	Ramirez & Galetti 2015	51°C
	AnosCytBR	5'- TCTTCGGATTACAAGACCG - 3'		
D-loop	DloopL	5'- AGAGCGTCGGTCTTGTAACC - 3'	Cronin et al. 1993 Meyer et al. 1990	54°C
	H16498	5'- CCTGAAGTAGGAACCAGATG - 3'		
RAG2	RAG2_164F	5'- AGCTCAAGCTGCGYGCCAT - 3'	Oliveira et al. 2011	55°C (Ambas PCRs)
	1 <sup>st</sup> Round RAG2_R6	5'- TGRTCCARGCAGAAAGTACTTG - 3'		
	2 <sup>nd</sup> Round RAG2_176R	5'- GYGCCATCTCATTCTCCAACA - 3'		
	RAG2Ri	5'- AGAACAAAAGATCATTGCTGGTTCGGG - 3'		
S7	S7RPEX1-F	5'- TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC - 3'	Chow & Hazama 1998	56°C
	S7RPEX2-R	5'- AACTCGTCTGGCTTTTCGCC - 3'		

#### Referência

Chow, S. & Hazama, K. (1998) Universal PCR primers for *S7* ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology*, **7**, 1255-1256.

Cronin, M. A., Spearman, W. J., Wilmot, R.L., Patton, J. C. & Bickham, J. W. (1993) Mitochondrial DNA variation in chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of Polymerase Chain Reaction (PCR) products. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**, 708-715.

Meyer, A., Kocher, T. D., Basasibwaki P. & Wilson, A. C. (1990) Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, **347** (6293), 550-553.

Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguella, T. C., Benine, R. C., Ortí, G., Vari, R. P. & Castro, R. M. C. (2011) Phylogenetic relationships within the speciose Family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 275.

Ramirez, J. L. & Galetii Jr., P. M. (2015) DNA Barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta* Cope 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **93**, 77-82.

Ward, R. D., Zemlak, T.S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. N. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, **360**, 1847-1857.

Tabela S3 – Probabilidade posterior bayesiana estimada usando DIYABC para cada cenário (Rodada 1 – *Salminus hilarii*).

<i>Salminus hilarii</i>	Probabilidade posterior (95% HPD)
<b>Rodada 1</b>	
Geodispersão (São Francisco é a bacia-fonte)	
Cenário 1 - Bacia Alto Paraná captura parte da bacia São Francisco (SF1)	<b>0.5636 (0.5345-0.5928)</b>
Cenário 2 - Bacia Alto Paraná captura parte da bacia São Francisco (SF2)	0.4364 (0.4072-0.4655)
Geodispersão (Alto Paraná é a bacia-fonte)	
Cenário 1 - Bacia São Francisco (SF1) captura parte da bacia Alto Paraná	0.3247 (0.2731-0.3764)
Cenário 2 - Bacia São Francisco (SF2) captura parte da bacia Alto Paraná	<b>0.6753 (0.6236-0.7269)</b>
Vicariância	
Cenário 1 - Bacia Alto Paraná e bacia São Francisco (SF1) divergem da população ancestral	0.3369 (0.2746-0.3992)
Cenário 2 - Bacia Alto Paraná e bacia São Francisco (SF2) divergem da população ancestral	<b>0.6631 (0.6008-0.7254)</b>

Tabela S4: Distribuição *a priori* dos parâmetros para cada cenário (Fig. 3).

	Parâmetros	Distribuição dos <i>priors</i>
<i>Salminus brasiliensis</i>		
Tamanho efetivo da linhagem PUL	$N_{PUL}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da linhagem Alto Paraná	$N_{AP}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da população ancestral	$N_a$	Uniforme ( $10^5$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da população fundadora da linhagem PUL	$N_{PULf}$	Log-uniforme ( $10^2$ , $10^4$ )
Tamanho efetivo da população fundadora da linhagem Alto Paraná	$N_{APf}$	Log-uniforme ( $10^2$ , $10^4$ )
Tempo da expansão populacional após o evento fundador	$t1$	Uniforme ( $4 \times 10^5$ , $6 \times 10^5$ )
Tempo de divergência (cenário de vicariância) ou do evento fundador (cenário de geodispersão) entre as linhagens PUL e Alto Paraná	$t3$	Uniforme ( $4 \times 10^5$ , $5 \times 10^5$ )
<i>Salminus</i> sp. Amazonas e <i>Salminus</i> sp. Araguaia		
Tamanho efetivo da espécie Araguaia	$N_{ToA}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da espécie Amazonas	$N_{Am}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da população ancestral	$N_a$	Uniforme ( $10^5$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da população fundadora da espécie Araguaia	$N_{ToAf}$	Log-uniforme ( $10^2$ , $10^4$ )
Tamanho efetivo da população fundadora da espécie Amazonas	$N_{Amf}$	Log-uniforme ( $10^2$ , $10^4$ )
Tempo da expansão populacional após o evento fundador	$t1$	Uniforme ( $5 \times 10^5$ , $2 \times 10^6$ )
Tempo de divergência (cenário de vicariância) ou do evento fundador (cenário de geodispersão) entre as espécies <i>Salminus</i> sp. Araguaia e <i>Salminus</i> sp. Amazonas	$t3$	Uniforme ( $5 \times 10^5$ , $2.5 \times 10^6$ )
<i>Salminus hilarii</i>		
Primeira rodada		
São Francisco é a bacia-fonte (evento de geodispersão)		
Tamanho efetivo da linhagem São Francisco_1	$N_{SF1}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da linhagem São Francisco_2	$N_{SF2}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )

Tamanho efetivo da linhagem Alto Paraná	$N_{AP}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da população fundadora da linhagem Alto Paraná	$N_{APf}$	Log-uniforme ( $10^2$ , $10^4$ )
Tempo de divergência entre as linhagens São Francisco_1 e São Francisco_2	$t_s$	Uniforme ( $4 \times 10^4$ , $6 \times 10^5$ )
Tempo da expansão populacional após o evento fundador	$t_1$	Uniforme ( $3 \times 10^5$ , $1.4 \times 10^6$ )
Tempo do evento fundador da linhagem do Alto Paraná	$t_3$	Uniforme ( $3 \times 10^5$ , $1.8 \times 10^6$ )

Alto Paraná é a bacia-fonte (evento de geodispersão)

Tamanho efetivo da linhagem São Francisco_1	$N_{SF1}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da linhagem São Francisco_2	$N_{SF2}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da linhagem Alto Paraná	$N_{AP}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da população fundadora da linhagem São Francisco (São Francisco_1)	$N_{SF1f}$	Log-uniforme ( $10^2$ , $10^4$ )
Tamanho efetivo da população fundadora da linhagem São Francisco (São Francisco_2)	$N_{SF2f}$	Log-uniforme ( $10^2$ , $10^4$ )
Tempo de divergência entre as linhagens São Francisco_1 e São Francisco_2	$t_s$	Uniforme ( $4 \times 10^4$ , $6 \times 10^5$ )
Tempo da expansão populacional após o evento fundador	$t_1$	Uniforme ( $3 \times 10^5$ , $1.4 \times 10^6$ )
Tempo do evento fundador da linhagem do São Francisco	$t_3$	Uniforme ( $3 \times 10^5$ , $1.8 \times 10^6$ )

Evento de vicariância

Tamanho efetivo da linhagem São Francisco_1	$N_{SF1}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da linhagem São Francisco_2	$N_{SF2}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da linhagem Alto Paraná	$N_{AP}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da população ancestral	$N_a$	Uniforme ( $10^5$ , $10^6$ )
Tempo de divergência entre as linhagens São Francisco_1 e São Francisco_2	$t_s$	Uniforme ( $4 \times 10^4$ , $6 \times 10^5$ )
Tempo de divergência entre as linhagens do Alto Paraná e São Francisco	$t_3$	Uniforme ( $3 \times 10^5$ , $1.8 \times 10^6$ )

Segunda rodada

Tamanho efetivo da linhagem São Francisco_1	$N_{SF1}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da linhagem São Francisco_2	$N_{SF2}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da linhagem Alto Paraná	$N_{AP}$	Uniforme ( $10^4$ , $10^6$ )

Tamanho efetivo da população ancestral	$N_a$	Uniforme ( $10^5$ , $10^6$ )
Tamanho efetivo da população fundadora da linhagem São Francisco (São Francisco_2)	$N_{SF2f}$	Log-uniforme ( $10^2$ , $10^4$ )
Tamanho efetivo da população fundadora da linhagem Alto Paraná	$N_{APf}$	Log-uniforme ( $10^2$ , $10^4$ )
Tempo de divergência entre as linhagens São Francisco_1 e São Francisco_2	$t_s$	Uniforme ( $4 \times 10^4$ , $6 \times 10^5$ )
Tempo da expansão populacional após o evento fundador	$t_1$	Uniforme ( $3 \times 10^5$ , $1.4 \times 10^6$ )
Tempo de divergência (cenário de vicariância) ou do evento fundador (cenário de geodispersão) entre as linhagens Alto Paraná e São Francisco	$t_3$	Uniforme ( $3 \times 10^5$ , $1.8 \times 10^6$ )
Média da taxa de mutação por geração para marcadores nucleares	$\mu_n$	Uniforme ( $10^{-9}$ , $10^{-8}$ )
Média da taxa de mutação por geração para marcadores mitocondriais	$\mu_m$	Uniforme ( $10^{-8}$ , $10^{-7}$ )

N: tamanho populacional efetivo; t: tempo em gerações; f: fundador;  $\mu$ : média da taxa de mutação

Tabela S5 – Taxas de erro tipo I e tipo II estimadas para cada cenário vencedor de cada espécie usando DIYABC.

Espécie	Cenário vencedor	Taxa do erro tipo II			Taxa do erro tipo I
		Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3	
<i>S. brasiliensis</i>	<b>Cenário 1</b>	-	9.4%	9.4%	39.8%
<i>S. sp. Amazonas</i> e <i>S. sp. Araguaia</i>	<b>Cenário 1</b>	-	30.2%	28%	51.2%
<i>S. hilarii</i>	<b>Cenário 2</b>	27.6%	-	25.8%	45.6%

## 6. Considerações finais

O presente estudo concentrou-se em lacunas de informações do gênero *Salminus* que estavam associadas às questões taxonômicas, filogenéticas e filogeográficas. Além de gerar informações científicas sobre o gênero, o nosso propósito foi proporcionar subsídios técnico-científicos eficazes para auxiliar no status de conservação das populações de *Salminus* e, adicionalmente, compreender os processos evolutivos responsáveis pela diversificação dos peixes Neotropicais.

Os resultados apresentados em ambos os capítulos suportam a ideia de que a ictiofauna dulcícola neotropical ainda é subestimada, principalmente devido à presença de diversidade críptica (PEREIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2013). Segundo Reis et al. (2016) o número real de espécies da região pode alcançar 9100, número duas vezes maior do que o atualmente estimado. Essa subestimação é um desafio para programas de conservação, uma vez que identificação da biodiversidade representa o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados à sua avaliação e gestão. Para *Salminus*, por exemplo, apesar do severo declínio populacional (AGOSTINHO, 1999; SATO; GODINHO, 2003), a falta de clareza na delimitação das espécies e até de unidades evolutivas significativas (UES) provavelmente conduziu suas ausências nas listas de espécies ameaçadas. Por isso, há uma real necessidade em acelerar e simplificar o processo de identificação e delimitação das espécies. Conforme demonstrado, o emprego de marcadores moleculares representa uma ferramenta promissora para uma rápida e correta identificação de espécimes, sinalizar espécies com prováveis problemas taxonômicos, além de ser uma abordagem eficaz para revelar a diversidade críptica.

Nós observamos que *S. brasiliensis* e *S. hilarii* apresentam linhagens mitocondriais (COI e CytB) divergentes que estão estruturadas geograficamente. Essas linhagens divergentes estão localizadas nas mesmas bacias hidrográficas onde foram descritas variações morfológicas intraespecíficas (LIMA, 2006; ROSSO et al., 2012; SHIBATTA; GARAVELLO, 1993). *S. hilarii* da bacia do Alto rio Paraná e rio São Francisco é uma unidade molecular distinta daquela encontrada na bacia do Tocantins-Araguaia e Amazonas. Em sua tese, Lima (2006) propõe ressuscitar o nome *Salminus iquitiensis* (Nakashima, 1941) para designar espécimes, erroneamente denominados de *S. hilarii*, provenientes das bacias do Amazonas, Tocantins-Araguaia e Orinoco. A razão reside em um carácter sinapomórfico desses espécimes: numerosas e pequenas listras discretas escuras longitudinais, concentradas na porção média e central da nadadeira caudal. A metodologia de DNA *barcoding* corrobora essa afirmação e a filogenia e filogeografia do gênero reforçam que, de fato, são unidades que

evoluíram independentemente e não apresentam ancestral comum mais recente que as conectem diretamente.

Ainda com relação à *S. iquitensis*, baseado em nossos dados, propomos que, uma vez validado o nome, este seja empregado apenas para os espécimes da bacia do Amazonas (local do holótipo). Espécimes da bacia do Tocantins-Araguaia devem ser descritos. A variação morfológica entre espécimes das duas bacias suporta nossa proposta. Espécimes do Tocantins-Araguaia, apresentam corpo mais alto e número menor tanto de escamas na linha lateral (contados a partir da nadadeira dorsal até a linha lateral) quanto de raios ramificados na nadadeira anal quando comparados com os espécimes do Alto Amazonas (LIMA, 2006). Futuras análises precisam ser realizadas levando em consideração a amostragem do Orinoco para identificar a qual dos grupos os espécimes dessa bacia pertencem. Portanto, baseado em dados moleculares e polimorfismos morfológicos nas bacias, sugerimos duas novas espécies para o gênero, denominadas aqui de *S. sp. Amazonas*, que deve ser considerada como *S. iquitensis*, e *S. sp. Araguaia*, que quando descrita deverá ser denominada diferentemente da anterior.

Para a espécie *S. brasiliensis*, apesar de existirem contradições sobre sua unicidade como espécie (LIMA et al., 2003; ROSSO et al., 2012), a análise *multiloci* suporta a monofilia da espécie. Portanto, por hora, apesar da possibilidade do único nuclear informativo para essa questão represente uma questão de ILS, apoiaremos a hipótese que *S. brasiliensis* é constituído por uma única unidade taxonômica e que as linhagens, identificadas como Alto rio Paraná e PUL, sejam consideradas UES. Inclusive, essa abordagem sugere precaução na utilização da metodologia de DNA *barcoding*, que não deve ser a única ferramenta de delimitação de espécies. A metodologia sinaliza prováveis incongruências que devem ser melhor investigadas. No presente trabalho, a associação com outros marcadores independentes nos permitiu uma resposta mais acurada acerca do status de *S. brasiliensis*. Também adotamos essa posição mais conservadora para as linhagens de *S. hilarii* do Alto rio Paraná e rio São Francisco. Apesar de Shibatta e Garavello (1993) apoiarem que ambas sejam consideradas espécies distintas, nós sugerimos que seja mantida como uma única unidade. Esse posicionamento também é decorrente da divergência entre as unidades sugeridas pelo DNA *barcoding* e análise *multiloci*.

Portanto, baseada na análise *multiloci* e no emprego do conceito filogenético de espécie, propomos um novo cenário taxonômico para *Salminus*. O gênero passaria a ser constituído por seis espécies (Apêndice 1): *S. affinis*, *S. franciscanus*, *S. brasiliensis*, *S. hilarii*, *S. sp. Amazonas* (= *S. iquitensis*) e *S. sp. Araguaia*. Para conservação, conforme

mencionado, uma clara designação das espécies por si só já acarreta em uma informação valiosa. Como essas espécies estão localizadas em uma única bacia hidrográfica (exceto *S. brasiliensis* e *S. hilarii*), cada bacia passa ser avaliada como uma unidade biogeográfica importante para a manutenção dos processos que sustentam a permanência das espécies.

Segundo Moritz (2002), os maiores desafios para o estabelecimento de estratégias conservacionistas é compreender que mudanças dos habitats são inevitáveis e que os conflitos entre manter a diversidade biológica e as necessidades das sociedades humanas são comuns e precisam ser reconciliadas com o mínimo de impacto para ambas. Sabendo disso, é utópico acreditar que espécies com importância econômica como os *Salminus*, consideradas recursos pesqueiros e não como biodiversidade aquática, perante a legislação<sup>7</sup>, tenham medidas protetivas ideais, como suspensão da pesca comercial e esportiva e preservação do habitat onde vivem. Por isso, tentando buscar alternativas mais realísticas propomos uma análise genético-populacional das espécies presentes em uma única bacia hidrográfica, para avaliar a presença ou não de estruturação da diversidade genética. Em caso afirmativo, deve-se desenvolver estratégias de manejo entre espécimes do mesmo grupo genético, a fim de evitar depressão exogâmica e manter a diversidade genética da espécie (MORITZ, 2002). Para *S. brasiliensis* e *S. hilarii* que apresentam uma ampla distribuição e que UES foram identificadas, o manejo entre bacias também deve ser evitado, pela mesma razão discutida anteriormente. Essa proposta é simples, porém importante, porque em praticamente todas as grandes bacias hidrográficas brasileiras há o empreendedorismo hidrelétrico e uma das práticas comuns de mitigação de impactos ambientais é o repovoamento para recuperar os estoques pesqueiros. Portanto, as informações genético-populacionais auxiliarão no manejo adequado.

A identificação das UES foi um traço importante do nosso estudo, pois, conforme abordado no capítulo 1, a espécie *S. brasiliensis*, por exemplo, não foi incluída na lista vermelha brasileira, porque algumas populações da espécie já se encontravam em uma área de proteção ambiental (ROSA; LIMA, 2008). Entretanto, esse tipo de afirmação não pleiteia as populações, de potencial evolutivo único, existente na bacia do Alto rio Paraná, uma ecorregião aquática extremamente fragmentada por um sistema de usinas hidrelétricas. Por necessitarem percorrer grandes distâncias para completar seu ciclo reprodutivo, as populações de *S. brasiliensis* e *S. hilarii* do Alto rio Paraná estão sob risco de extinções a longo prazo,

---

<sup>7</sup> Lei n° 11.959/2009 dispõe sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca. Artigo 2°, inciso I, definições: recursos pesqueiros são todos os “animais e vegetais hidróbios passíveis de exploração, estudo ou pesquisa pela pesca amadora, de subsistência, científica, comercial e pela aquicultura”.

caso nenhuma medida seja tomada. Pensando em viabilizar essas populações, a preservação de afluentes que possuam características semelhantes ao da calha principal é uma alternativa promissora (ROSA; LIMA, 2008). Por isso, propomos a criação de uma unidade de conservação em uma porção do Alto rio Paraná que apresente potencial em manter as populações das duas espécies. Uma região livre de hidrelétricas, situado em um trecho com características originais do rio, permitindo assim migração reprodutiva, desova e desenvolvimento de larvas, e que também é uma área histórica de distribuição para as duas espécies é no rio Turvo, afluente da bacia do rio Grande, situado no estado de São Paulo. Essa unidade de conservação protegeria não apenas as necessidades das espécies, mas também outras espécies de necessidades menores que despertam pouco ou nenhum interesse comercial. Incentivamos outros estudos que auxiliem a conservação das espécies de *Salminus*, tendo em vista a importância ecológica para a manutenção dos ecossistemas em que vivem.

Quanto à utilização das espécies de *Salminus* como modelo biológico para compreender os processos evolutivos responsáveis pelo atual padrão de distribuição da ictiofauna sul-americana (capítulo 2), nós reforçamos que eventos de vicariância e geodispersão tiveram um papel importante. Entretanto, não descartamos a relevância das oscilações climáticas do Pleistoceno (HAFFER, 1982) e flutuações no nível do mar, principalmente do Mioceno (NORES, 1999). Diante da complexidade de padrões biogeográficos da região, acreditamos que as interações entre todos os eventos moldaram a diversidade da ictiofauna neotropical.

O emprego das espécies para identificar assinaturas genéticas para os eventos biogeográficos, representa um grande avanço para estudos filogeográficos. Outros cenários biogeográficos também podem ser testados. Além das hipóteses Paleogeográfica e Hidrogeológica, a hipótese Museu apresenta um grande impacto nos processos de diversificação da ictiofauna neotropical. Segundo a hipótese, as incursões marinhas ocorridas no Mioceno, teriam fragmentado as populações de espécies com ampla distribuição isolando-as em áreas mais altas. Com isso, teríamos linhagens basais presentes nos escudos cristalinos e as linhagens mais recentes teriam surgido após as regressões marinhas e ocupado as terras mais baixas (HUBERT et al., 2007). A assinatura biogeográfica seria de áreas elevadas com altos níveis de endemismo (chamadas de refúgio), enquanto as áreas baixas teriam alta diversidade de espécies, porém baixos níveis de endemismo (HUBERT; RENNO, 2006). A criação de um cenário ABC para uma única incursão marinha não é complexa. A assinatura genética que esperamos para esse evento é de uma população ancestral, de tamanho efetivo  $N_e$ , que no tempo  $t_i$  (onde “i” representa os eventos de incursões marinhas conhecidos) sofre

uma fragmentação, resultando populações filhas fundadoras com tamanho efetivo menor que a ancestral. Posteriormente, há uma expansão populacional no tempo  $t_1, t_2 \dots t_n$  (os tempos estão condizentes com o número de populações filhas; essa expansão populacional não ocorre no mesmo momento, por isso necessitam de designações diferentes). Se outras incursões não ocorrerem, e se as populações-filhas não entrarem em contato umas com as outras, esperamos que estas evoluam independentemente, chegando ao presente como linhagens distintas. Reconstrução do cenário de incursão é simples, porém dependendo do conjunto de dados deve ser melhor adaptado, o que também deve acontecer nos outros cenários biogeográficos aqui testados.

A abordagem ABC deve ser considerada pelos pesquisadores em estudos filogeográficos, pois permite comparações de modelos alternativos, além de estimar parâmetros relevantes em estudos ecológicos, como tamanho efetivo populacional (BERTORELLE; BENAZZO; MONA, 2010). Ela é mais interessante que cenários baseados em verossimilhança porque utiliza modelos mais realísticos e mais complexos.

Atualmente há uma variedade de softwares que utilizam essas análises. O DIYABC, empregado nesse estudo, apresenta algumas limitações como não ser capaz de considerar migrações nem sobreposição de gerações (BERTORELLE; BENAZZO; MONA, 2010). Como isso afeta o conjunto de dados avaliados é incerto. No nosso caso, a migração não é um problema, pois, uma vez ocorrido o evento alopátrico, as populações passaram a evoluir independentemente. Portanto, incentivamos sua utilização, principalmente, devido à interface amigável, permitindo o uso por leigos em linguagem computacional.

Em suma, a presente tese providenciou um novo panorama taxonômico do gênero *Salminus*, com sugestões que devem ser avaliadas por especialistas. Também identificamos como as espécies estão relacionadas filogeneticamente entre si e quais os processos de vicariância e geodispersão foram os responsáveis pela diversificação do gênero. Estas análises nos permitiram propor medidas de manejo seguro para as espécies. Para uma próxima etapa, é interessante avaliar as variações morfológicas das espécies *S. hilarii* e *S. brasiliensis* coincidentes com linhagens mitocondriais, porém não com os marcadores nucleares aqui utilizados. Uma análise utilizando mais marcadores nucleares informativos ou até mesmo sequenciamento de próxima geração poderia oferecer um panorama mais acurado sobre o que essa variação representa: se são unidades taxonômicas distintas ou se são adaptações fenotípicas mediante ao ambiente que habitam.

## Referências bibliográficas

AGOSTINHO, A. A. et al. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: TUNDISI, J. G.; STRASKRABA, M. **Theoretical reservoir ecology and its applications**. São Carlos: International Institute of Ecology, 1999. p. 227-265.

BERTORELLE, G.; BENAZZO, A.; MONA, S. ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 2609-2625, 2010.

HAFFER, J. General aspects of the refuge theory. In: PRANCE, G. T. **Biological Diversification in the Tropics**. New York: Columbia University Press, 1982. p. 6-24.

HUBERT, N. et al. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: Implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2115-2136, 2007.

HUBERT, N.; RENNO, J-F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, p. 1414-1436, 2006.

LIMA, F. C. T. et al. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, 2003. p. 106-169.

MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary process that sustain it. **Systematic Biology**, v. 51, n. 2, p. 238-254, 2002.

NORES, M. 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**, v. 13, p. 149-161, 2004.

PEREIRA, L. H. G. et al. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, v. 14, p. 20, 2013.

PEREIRA, L. H. G. et al. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná basin of Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 22, n. S1, p. 87-96, 2011.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, doi:10.1111/jfb.13016, 2016.

ROSA, R. S.; LIMA, F. T. Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. MMA, Belo Horizonte, MG, Fundação Biodiversitas, 2008.

ROSSO, J. J. et al. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, p. 999–1011, 2012.

SATO, Y.; GODINHO, H. P. Migratory fishes of the São Francisco River. In: CAROLSFELD, J. et al. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, Washington, DC, Estados Unidos da América, 2003. p. 195-232.

SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of Neotropical cascudinhos (Siluriformes: Loricariidae). In: MALABARBA, L. R. et al. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs, 1998. p. 375–400.

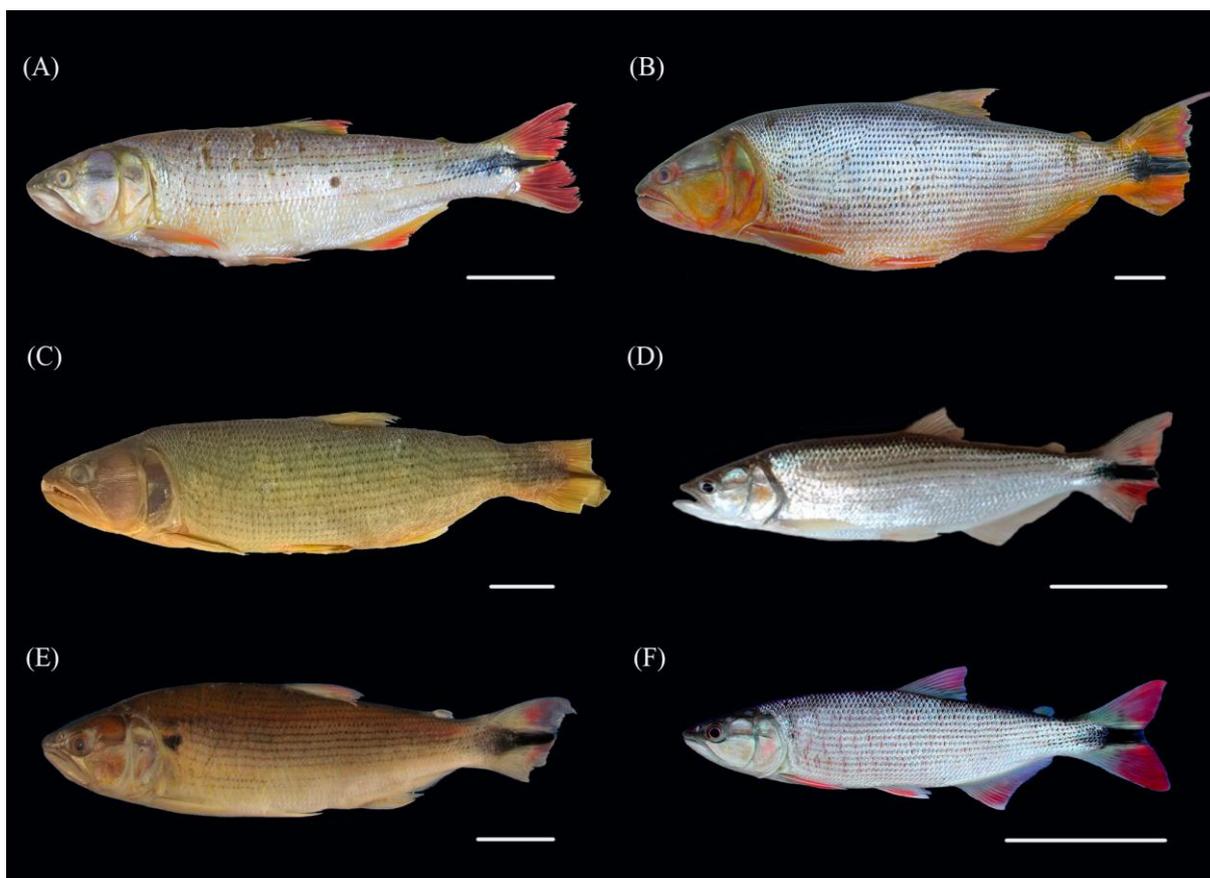
SHIBATTA, O. A.; GARAVELLO, J. C. Estudo da variação geográfica em *Salminus hilarii* Valenciennes, 1849, das Bacias do Alto Paraná e São Francisco, através da análise morfométrica multivariada em componentes principais. **Naturalia**, v. 18, p. 109-116, 1993.

## 7. Conclusões

1. Através da análise *multiloci* e utilizando o conceito filogenético de espécie, propomos um novo cenário taxonômico para *Salminus*. O gênero passa a ser constituído por seis espécies: *S. affinis*, *S. franciscanus*, *S. brasiliensis*, *S. hilarii*, *S. sp. Amazonas* (= *S. iquitensis*) e *S. sp. Araguaia*.
2. O ótimo *threshold* utilizado para identificar as unidades moleculares, calculado a partir do nosso conjunto de dados, foi menor do que aquele padronizado para peixes neotropicais. Devido às taxas mutacionais variáveis e diferentes histórias de vida, valores de *threshold* fixos acarretam problemas de sub ou sobreestimação de unidades moleculares.
3. A utilização do DNA *barcoding* não deve ser a única ferramenta de delimitação de espécies. A metodologia é eficaz na sinalização de prováveis incongruências com a taxonomia vigente que devem ser melhor investigadas. A utilização de mais marcadores moleculares informativos com heranças distintas é uma alternativa viável para esclarecimento do status taxonômico das espécies.
4. Os mecanismos promotores de especiação alopátrica das hipóteses paleogeográfica e hidrogeológica foram os responsáveis pela diversificação das espécies do gênero *Salminus*.
5. Os eventos de geodispersão e vicariância apesar de serem processos distintos podem gerar padrões biogeográficos semelhantes em determinadas situações. Entretanto, para análise ABC, ambos os eventos apresentam assinaturas filogeográficas distintas baseada na ocorrência (geodispersão) ou não (vicariância) de um efeito fundador na área colonizada.
6. A abordagem ABC deve ser considerada pelos pesquisadores em estudos filogeográficos, pois permite testar entre as principais hipóteses de diversificação da ictiofauna Neotropical (paleogeográfica, hidrogeológica e museu) a mais provável para o conjunto de dados avaliado. Além de estimações de parâmetros relevantes em estudos ecológicos, como tamanho efetivo populacional.

## 8. Apêndice

Apêndice 1 – Fotografia das MOTUs de *Salminus* estimadas na análise *multiloci*. (A) *Salminus affinis* (indivíduo não analisado). (B) *Salminus brasiliensis* (indivíduo SB\_580). (C) *Salminus franciscanus* (indivíduo SF\_035). (D) *Salminus hilarii* (indivíduo SH\_160). (E) *Salminus* sp. Amazonas (indivíduo SI\_026). (F) *Salminus* sp. Araguaia (indivíduo não analisado)<sup>1</sup>. A barra de escala representa 5 cm. Fotos por (A) W. R. C. Flor, (B) – (E) C. Machado. (F) P. Venere.



<sup>1</sup>Fonte da imagem:

VENERE, P. C.; GARUTTI, V. **Peixes do Cerrado – Parque Estadual da Serra Azul – Rio Araguaia, MT.** São Carlos : RiMa Editora, FAPEMAT , 2011. 220 p.