

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

**Filogenia molecular e diversificação das arraias de ferrão de  
água doce (Família Potamotrygonidae) na América do Sul**

**Daniel Toffoli Ribeiro**

São Carlos - SP  
2013

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

**Filogenia molecular e diversificação das arraias de ferrão de  
água doce (Família Potamotrygonidae) na América do Sul**

**Daniel Toffoli Ribeiro**

**Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito**

**Co-orientador: Prof. Dr. Tomas Hrbek**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Genética e Evolução

São Carlos - SP  
2013

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

R484fm

Ribeiro, Daniel Toffoli.

Filogenia molecular e diversificação das arraiais de ferrão de água doce (Família Potamotrygonidae) na América do Sul / Daniel Toffoli Ribeiro. -- São Carlos : UFSCar, 2015. 127 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Genética e evolução. 2. Paleogeografia. 3. América do Sul. 4. Radiação. 5. Hibridação. 6. Potamotrygonidae. I. Título.

CDD: 575 (20<sup>a</sup>)

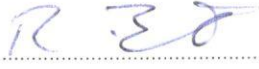
“Filogenia e diversificação das arraiais de ferrão de água doce (Família Potamotrygonidae) na América do Sul”

**DANIEL TOFFOLI RIBEIRO**

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE


Submetida à defesa pública no dia 09/10/2013, tendo sido aprovada.

Presidente: Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito




Membros:


Prof. Dr. Orlando Moreira Filho



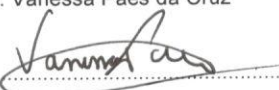
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.



Prof. Dr. César Martins




Dra. Vânia Paes da Cruz





Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas).  
Área de Concentração: Genética e Evolução.

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Homologado na 280 Reunião Ordinária da CPG,  
em 06/11/13.

Presidente: 

Membros: 



*“O amor por todas as criaturas  
vivas é o atributo mais nobre do  
homem”*

*- Charles Darwin*

# AGRADECIMENTOS

Agradeço profunda e sinceramente ao meu orientador, Dr. Reinaldo Alves de Brito. Em primeiro lugar por aceitar me orientar e usar irrestritamente seu laboratório. Segundo, pela liberdade conferida a mim para delimitar e perseguir a pergunta científica que julguei mais interessante, sempre com um olhar próximo e crítico. Terceiro, pela constante discussão, teórica e prática sobre assuntos da Biologia Evolutiva, fundamental para o aprofundamento e melhoria da qualidade da minha pesquisa e, mais importante, pela contribuição na minha formação como pesquisador. Por fim, pela compreensão das minhas dificuldades pessoais ao longo dessa tortuosa, porém cheia de maravilhosas descobertas e aprendizado, estrada que foi esse doutoramento.

Ao meu co-orientador, Dr. Tomas Hrbek, os meus sinceros agradecimentos pela ajuda na delimitação da pergunta científica e metodologias a serem aplicadas. Também pela possibilidade de adquirir parte dos dados genéticos em seu laboratório. Da mesma forma agradeço a Dra. Izeni Pires Farias que, embora não oficialmente, me orientou e apoiou em todas as etapas da execução desse trabalho, incluindo a possibilidade de obter dados em seu laboratório, que é compartilhado pelo Dr. Hrbek, e pela oportunidade de participar de expedições de coleta.

Agradeço ao atencioso companheiro de laboratório, Dr. Iderval da Silva Júnior Sobrinho, pelas inúmeras e profícuas discussões sobre a teoria e prática da Genética Evolutiva. Também pelas amistosas discussões sobre os mais variados aspectos da vida.

Aos companheiros do Laboratório de Genética de Populações e Evolução (São Carlos), pelos ensinamentos sobre o funcionamento do laboratório e práticas de bancada e também companheirismo e amizade: Iderval, Nelci, Gustavo, Fernanda, Vanessa, Bruno Sauce, Aline, Isabela, Marcos, Bruno Gabriel, Emeline, Janaína, Victor.

Da mesma forma agradeço aos companheiros do Laboratório de Evolução e Genética Animal (Manaus) pelos ensinamentos sobre o funcionamento do laboratório e práticas de bancada e também companheirismo e amizade.

Agradeço a Dra. Maria da Conceição Freitas Santos pela ajuda fundamental na obtenção das sequências de DNA nuclear.

Agradeço aos pesquisadores Patrícia Charvet-Almeida, Maria Lúcia Góes de Araújo, Mauricio Pinto de Almeida, Getúlio Rincon Filho, Stuart C. Willis, Sara Mello, Rafael Bernhard, César Martins, Guillermo Orti, Jansen Zuanon, Hernán López-Fernández, Natasha Meliciano e Olavo Colatreli pelo fornecimento de amostras de tecido para esse estudo.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular; e a todos os professores a ele vinculados pela participação na minha formação como pesquisador e por tornar possível a realização deste trabalho.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudo.

Agradeço por último, e com maior importância, a minha família querida, principalmente meus pais Carlos e Eleonora e minha Fabiana. Sem o seu apoio emocional incondicional em todos os momentos não seria possível a realização deste trabalho. Também gostaria de agradecer aos meus sogros, e também pais, José Alfredo e Sirlei, pela acolhida amorosa em sua casa durante parte do processo de escrita.

A todos que tiveram, e foram muitos, paciência e compreensão para comigo durante essa jornada, eu agradeço de coração. Fui sempre cercado de carinho, compreensão e suporte de forma que pude progredir no meu objetivo de conhecer a história evolutiva desse grupo tão fascinante que são as arraiais de água doce.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIV</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
EVOLUÇÃO PALEOGEOGRÁFICA DA AMÉRICA DO SUL NO NEÓGENO COM ÊNFASE NA BACIA AMAZÔNICA.....	5
<i>De ~ 24-11,8 Ma</i> .....	10
<i>De ~ 11,8–7 Ma</i> .....	15
<i>De ~ 7-2,5 Ma</i> .....	18
<i>De ~ 2,5 Ma ao presente</i> .....	20
ARRAIAS DE ÁGUA DOCE DA FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE .....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<i>Amostragem dos táxons</i> .....	26
<i>Distribuição geográfica dos táxons analisados</i> .....	28
<i>Extração de DNA, amplificação e sequenciamento</i> .....	31
<i>Análise das sequências</i> .....	32
<i>Análise filogenética</i> .....	33
<i>Estimativa de datas de divergência</i> .....	34



<i>Estimativa de taxa de diversificação</i> .....	35
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<i>Análise filogenética</i> .....	39
<i>Estimativa de idades de divergência</i> .....	41
<i>Padrões de diversificação</i> .....	44
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<i>Invasão e adaptação a água doce</i> .....	46
<i>Filogenia de Potamotrygonidae e idades de cladogênese</i> .....	48
<i>Diversificação de Potamotrygonidae e insights da Evolução Paleogeográfica da América do Sul</i> .....	54
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>69</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>70</b>
GRUPO DE ESTUDO: RADIAÇÃO DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE DO GÊNERO POTAMOTRYGON .....	76
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>78</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>79</b>
<i>Amostragem dos táxons</i> .....	79
<i>Análise laboratorial</i> .....	79
<i>Análise das sequências</i> .....	81
<i>Análise filogenética e testes de congruência</i> .....	81
<i>Discordância biogeográfica</i> .....	84
<i>Isolamento completo vs. divergência com fluxo gênico</i> .....	84

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>86</b>
<i>Varição genética.....</i>	<i>86</i>
<i>Congruência entre DNAm, nuclear e taxonomia.....</i>	<i>87</i>
<i>Análise filogenética dos dados combinados de DNAm.....</i>	<i>88</i>
<i>Análise filogenética do gene nuclear RAG1.....</i>	<i>90</i>
<i>Modelo de Isolamento com Migração por coalescência.....</i>	<i>93</i>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>101</b>
<i>Sorteamento incompleto de linhagens vs. hibridação.....</i>	<i>101</i>
<i>Radiação e fronteira entre espécies.....</i>	<i>103</i>
<i>Implicação das hibridações múltiplas na radiação.....</i>	<i>105</i>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>108</b>

# LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Mapa da América do Sul colorido por altitude. Linha preta demarca distribuição geográfica da família Potamotrygonidae. Nazca ridge visível na placa de Nazca e sua projeção inferida sob a placa Sul-americana, originando o arco de Fitzcarraldo. Observe os cinturões sucessivamente com mais baixas altitudes no sentido SW-NE, a partir desse arco até o Rio Negro (ver texto). Áreas amostradas: 1. Pacífico, 2. Atlântico, 3. lago Maracaibo, rios 4. Parguaza 5. Caura, 6. Mavaca, 7. Tarauacá, 8. Juruá, 9. Jarauá, 10. Purus, 11. Aripuanã, 12. Médio Amazonas, 13. Negro, 14. Maués, 15. Tapajós (montante e jusante de corredeiras), 16. Baixo Amazonas, 17. Jari, 18. Araguari, 19. Xingu, 20. Tocantins, 21. Boca Amazonas, 22. Azul, 23. Cuiabá, 24. Paraná. ....4
- Figura 1.2** Diagrama ilustrando à esquerda o período de encurtamento e provável soerguimento dos Andes ao longo do tempo, compilado de Oncken et al. (2006) (linha tracejada) e Echevarria (2003)(linha pontilhada). As estrelas indicam os principais picos de encurtamento. À direita, curva eustática dos oceanos. Modificados de Uba (2006) e Haq (1987), respectivamente.....6
- Figura 1.3** Sistema de Bacia Antepaís (*foreland*). Modificado de DeCelles e Giles, 1996. Retirado do Wikipedia. ....7
- Figura 1.4** Evolução Paleogeográfica da América do Sul no Neógeno. Para explicação, ver Caixa 1.....12
- Figura 1.5** Espécies e morfotipos estudados.....27
- Figura 1.6** Árvore consenso de Máxima Versossimilhança de Potamotrygonidae. Valores de suporte abaixo dos nós obtidos da árvore ML e acima dos nós pela árvore Baiesiana.....42
- Figura 1.7.** Cronograma da árvore Potamotrygonidae. O polígono representa mudança (aumento) na taxa de diversificação, estimada pela estatística *rate cladogenesis* (rc). Abaixo indicado nível do mar (linha) e três episódios de maior encurtamento dos Andes (ver figura 1.2) .....43
- Figura 1.8** *Lineages through time plot*. Em vermelho, árvore empírica; em azul, intervalo de confiança de 95% estimado a partir da simulação de 1000 árvores *pure-birth*. A árvore empírica cai abaixo do intervalo de confiança a ~2,5 Ma (concavidade), sugerindo aumento na taxa de especiação.....45
- Figura 1.9.** Distribuição da estatística gamma de 1000 árvores simuladas sob o processo de *birth-death*. Linhas indicam intervalo de confiança de 95% e a seta o valor da árvore empírica de Potamotrygonidae. ....45
- Figura 2.1.** Árvore de gene contida na árvore de espécies. Comprimento dos ramos simboliza tempo, medido em unidades de coalescência (tempo, em anos dividido por tamanho efetivo). Largura dos ramos simboliza tamanho efetivo. A) Separação há mais tempo e tamanhos efetivos menores geraram monofiletismo; B) Separação há menos tempo e maior tamanho efetivo levaram ao polifiletismo; C) hibridação recente leva ao polifiletismo. ....71
- Figura 2.2** Árvore de gene corresponderá à topologia da árvore de espécies, proporcionalmente ao tempo transcorrido entre sucessivos eventos de cladogênese, e inversamente proporcional ao tamanho efetivo populacional. A) Pequeno intervalo entre sucessivas cladogêneses leva a uma topologia incongruente entre a árvore de espécies e árvore de genes; B) Tempo mais longo de isolamento entre A e B, e menor tamanho efetivo de B leva a uma correta topologia (A(B,C)), embora o relativo grande tamanho populacional de B, e pouco tempo de isolamento com C, faz com que a primeiro seja parafilético em relação ao segundo.....72
- Figura 2.3.** Rios amostrados. Distribuição geográfica da família Potamotrygonidae circunscrita por linha. 1. Parguaza, 2. Caura, 3. Mavaca, 4. Tarauaca, 5. Juruá, 6. Jarauá/médio Amazonas 1, 7. Purus, 8. Aripuanã, 9. médio Amazonas 2, 10. Negro, 11. Maués, 12. Tapajós à montante, 13. Tapajós à justante, 14. baixo Amazonas, 15. Jari, 16. Araguari, 17. Xingu, 18. Tocantins, 19. boca do Amazonas, 20 Azul, 21. Cuiabá, 22 Paraná.....80
- Figura 2.4.** Gráfico de dispersão de distância par-a-par não corrigida para ATPase vs. COI e RAG1. A linha representa x=y para a ATPase. Pontos abaixo dessa linha indicam taxa de substituição mais lenta. ATPase e

COI parecem não estar evoluindo a taxas diferentes ( $t = 0.7544$ ,  $P = 0.45$ ) mas ambas evoluem significamente mais rápido que o RAG1 (COI vs RAG1,  $t = 9.3776$ ,  $P < 0,0001$ ).....87

**Figura 2.5** Árvores de Máxima Verossimilhança de DNAm (ATPase+COI, A), e RAG1 (B). Números sobre os ramos são valores de bootstrap (em vermelho, valores abaixo de 70). As barras verticais pretas na frente dos clados e os nomes atribuídos a ela representam as espécies/morfotipos conforme definido por taxonomia e padrão de coloração. As barras presentes na árvore mitocondrial que apresentam nomes de localidade geográfica (e.g. rios e grandes áreas como Oeste - Bacia Amazônica Oeste e Escudo das Guianas – rios que drenam esse escudo) apontam proximidade filogenética entre indivíduos de espécies diferentes que ocorrem em simpatria. Ver texto para detalhes. ....92

**Figura 2.6** Clados da árvore para o gene RAG1 parafiléticos ou polifiléticos, agrupam espécies de bacias hidrográficas diferentes, mas padrão de coloração similar A) *P. motoro*, rio Araguari; B) *P. sp. marajo*, rio Araguari; C) *P. orbigny*, rio Jari; . Grupo *scobina*: D) *P. aff. scobina*, rio Caura; E) *P. aff. scobina*, rio Jari; e F) *P. falkneri*, rio Cuiabá. Grupo *leopoldi+henlei*: G) *P. henlei*, rio Araguaia; H) *P. leopoldi*, rio Suiá-Miçu; I) *P. sp. azul*, rio Azul; Grupo *assacu* J) *P. sp. assacu*, rio Jari; L) *P. sp. assacu*, rio Araguari; M) *P. s. sp. 2*, rio Azul.....94

**Figura 2.7** Curvas de probabilidade posterior dos parâmetros populacionais estimados no IMA2 para *P. orbigny* vs. *P. motoro*. Direção da migração mostrada no sentido da coalescência.....96

**Figura 2.8** Curvas de probabilidade posterior dos parâmetros populacionais estimados no IMA2 para *P. motoro* vs. *P. scobina*. Direção da migração mostrada no sentido da coalescência. ....97

**Figura 2.9** Curvas de probabilidade posterior dos parâmetros populacionais estimados no IMA2 para *P. orbigny* vs. *P. scobina*. Direção da migração mostrada no sentido da coalescência. ....98

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> Resumo de eventos paleogeográficos da América do Sul com potencial de influenciar na diversificação da fauna aquática.....	22
<b>Tabela 1.2</b> Localidade das espécies/morfotipos amostrados (numeradas conforme Fig.1.1).....	30
<b>Tabela 1.3</b> Primers utilizados nesse estudo. (F) e (R) representam <i>forward</i> e <i>reverse</i> , respectivamente.....	32
<b>Tabela 2.1</b> Hipóteses filogenéticas testadas contra árvore ML ótima não forçada por meio dos testes AU e SH.....	84
<b>Tabela 2.2</b> Hipóteses filogenéticas testadas contra árvore ML ótima não forçada por meio dos testes AU e SH. Resultado dos testes AU e SH quanto à diferença entre topologias alternativas baseadas nas hipóteses da tabela 2.1 e melhor árvore ML para os dados de RAG1 e DNAm <sub>t</sub> , respectivamente. Valores em negrito são significativos a 5%. DL = diferença do <i>log-likelihood</i> ; AU = probabilidade do teste AU; SH = probabilidade do teste H.....	88
<b>Tabela 2.3.</b> Estimativas dos parâmetros demográficos obtidos com o IMa2 entre pares de espécies (intervalo de probabilidade posterior a 95% em parênteses). A primeira espécie no título é representada por 0, e a segunda por 1. ....	99
<b>Tabela 2.4</b> Teste de modelos aninhados. por <i>log-likelihood ratio test</i> . Significância estatística evidenciada em negrito.....	100

## RESUMO

As redes de drenagem da América do Sul passaram por profundas transformações do Mioceno Tardio ao Pleistoceno, incluindo grandes transgressões marinhas, soerguimento dos Andes com conseqüente mudança nas redes de drenagem, e oscilações no nível eustático. Após transgressão marinha no final do Mioceno no noroeste da América do Sul, os ancestrais das arraias da família Potamotrygonidae adaptaram-se a água doce. Desde então o grupo vem se diversificando à medida que coloniza novas redes de drenagem, com o surgimento de novos fenótipos e adaptações a diferentes ambientes e dieta. Dado o conhecimento taxonômico atual, existem cerca de 24 espécies na família, número esse que certamente será elevado à medida que novas espécies já conhecidas forem descritas, e novas regiões geográficas forem amostradas.

Neste trabalho, apresento hipótese filogenética baseada em marcadores moleculares para a família Potamotrygonidae, com estimativa de idade dos eventos cladogenéticos e testes de mudança das taxas de especiação. A ocorrência de hibridação entre algumas espécies da família também foi testada. O padrão geográfico e tempo de diversificação das arraias da família Potamotrygonidae foram interpretados à luz dos principais eventos paleogeográficos que influíram nas mudanças das redes de drenagem da América do Sul durante o Neógeno, eventos esses revisados aqui.

Os dados corroboram a hipótese de origem da família no noroeste da América do Sul há aproximadamente 25 milhões de anos atrás, após grande transgressão marinha, época em que os Andes ainda não serviam de barreira topográfica entre o Mar do Caribe e as regiões costeiras dessa região. A partir daí as bacias hidrográficas foram diferencialmente colonizadas, sendo que as linhagens que deram origem aos gêneros *Heliotrygon* e *Plesiotrygon* possivelmente se originaram no sistema Pebas, enquanto que a linhagem que deu origem ao gênero *Potamotrygon* provavelmente ficou restrito à região compreendida hoje pelo alto Rio Negro/Oricono/Essequibo. Após a inversão do sentido do proto-Amazonas de Leste-Oeste para o sentido moderno Oeste-Leste e reorganização das bacias de drenagem que atingiram conformação próxima a atual, as arraias do gênero *Potamotrygon* colonizaram tanto a região a Oeste da Bacia Amazônica, anteriormente ocupada pelas *megawetlands* do

Sistema Pebas, quanto a região Leste, anteriormente isolada pelo Arco do Purus. Diferentemente da hipótese mais difundida, as idades de especiação estimadas sugerem que essa reorganização ocorreu há aproximadamente 3 milhões de anos atrás. Alternativamente, a inversão do proto-Amazonas pode ter ocorrido antes, mas a bacia do rio Negro teria se mantido isolada da bacia do rio Amazonas, ao menos a ponto de evitar a dispersão das arraiais.

Seguindo essa reorganização das drenagens, um grupo do gênero *Potamotrygon* denominado roseta-ocelado sofreu um aumento na taxa de especiação – radiação – à medida que novas regiões foram colonizadas. A colonização sentido rio acima das drenagens dos Escudos Cristalinos provavelmente ocorreu em período de águas mais altas no final do Plioceno, com posterior vicariância devido ao rebaixamento das águas. A Bacia do Paraguai-baixo Paraná provavelmente foi colonizada nessa mesma época, possibilitada pela conexão entre as cabeceiras do rio Paraguai e Bacia Amazônica, após subsidência do tipo *foredeep* desencadeada por soerguimento dos Andes. Durante o processo de radiação do grupo roseta-ocelado houve extensiva hibridação entre as espécies do grupo.

**Palavras-Chave:** Genética Evolutiva; Neógeno; América do Sul; Paleogeografia; Radiação; Hibridação; Potamotrygonidae

## ABSTRACT

The network of South American rivers network has experienced deep changes during Late Miocene through Pleistocene, including major marine transgressions, Andean uplift driving drainage changes, and changes in eustatic level. After a marine transgression during Late Miocene in northwest South America, the ancestor of freshwater stingrays (Potamotrygonidae) adapted to the freshwater environment. Since then, the group has diversified while colonizing new drainage networks, given rise to new phenotypes and diet preferences. There are currently 24 species described, a number that will certainly rise once new species already known are described and new geographical regions are sampled.

In the present work, I present a phylogeny for the Potamotrygonidae family based on molecular markers, with estimates of age and statistical tests of changes in rates of diversification while also testing for the occurrence of hybridization among some species of the family. The pattern of diversification in time and space was interpreted in light of major paleogeographical events that shaped drainage networks in South America during the Neogene,

Mitochondrial and nuclear data corroborate the hypothesis of family origin in northwest South America around 25 Million years ago (MYA), after a major marine transgression, in a time when the Andes was not a topographic barrier between the Caribbean Sea and coastal regions. After those hydrographic basins were differentially colonized, whereas lineages that given rise to the genera *Heliotrygon* and *Plesiotrygon* possibly originated in the Pebas System, the lineage that gave rise to *Potamotrygon* probably was restricted to the region that is now the upper Negro river/Orinoco/Essequibo. After the inversion of the proto-Amazonas direction from East-West to West-East and reorganization of drainages, the *Potamotrygon* stingrays colonized both West portions of the Amazon Basin, previously occupied by Pebas megawetlands, and an Eastern portion, previously isolated by the Purus Arch. Contrary to the more accepted hypothesis, the estimated speciation ages suggest that this reorganization occurred around 3 MYA. Alternatively, the inversion of proto-Amazonas may have occurred earlier but the Negro river basin was kept isolated from the



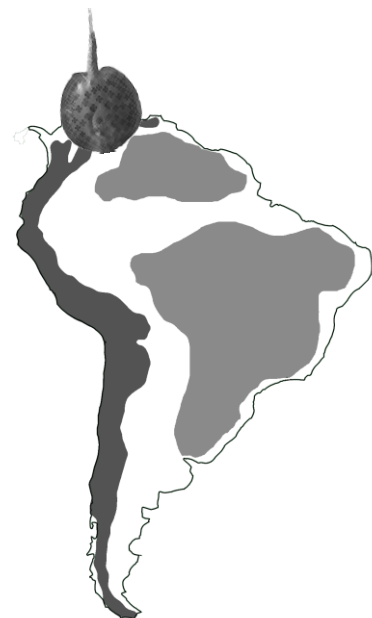
Amazon Basin at least as long to prevent stingrays dispersion.

Following the reorganization of the drainages, a group of *Potamotrygon* named spot-ocellated underwent an increase in speciation rate – a radiation – as new regions were colonized. Upstream colonization of Crystalline Shields probably occurred in periods of higher eustatic level at the end of Pliocene, followed by vicariance after reduction of water levels. The Paraguai-lower Paraná basin was probably colonized at this same time, after headwater capture between Paraguai and Amazon Basins driven by foredeep formation. During the radiation, extensive hybridization took place among species of the spot-ocellated group.

**Keywords:** Neogene; South America; Paleogeography; Radiation; Hybridization.

# Capítulo 1

**Colonização das drenagens em mudança da América do Sul no Neógeno pelas arraias de água doce (Potamotrygonidae) seguida de radiação**



# 1. Introdução

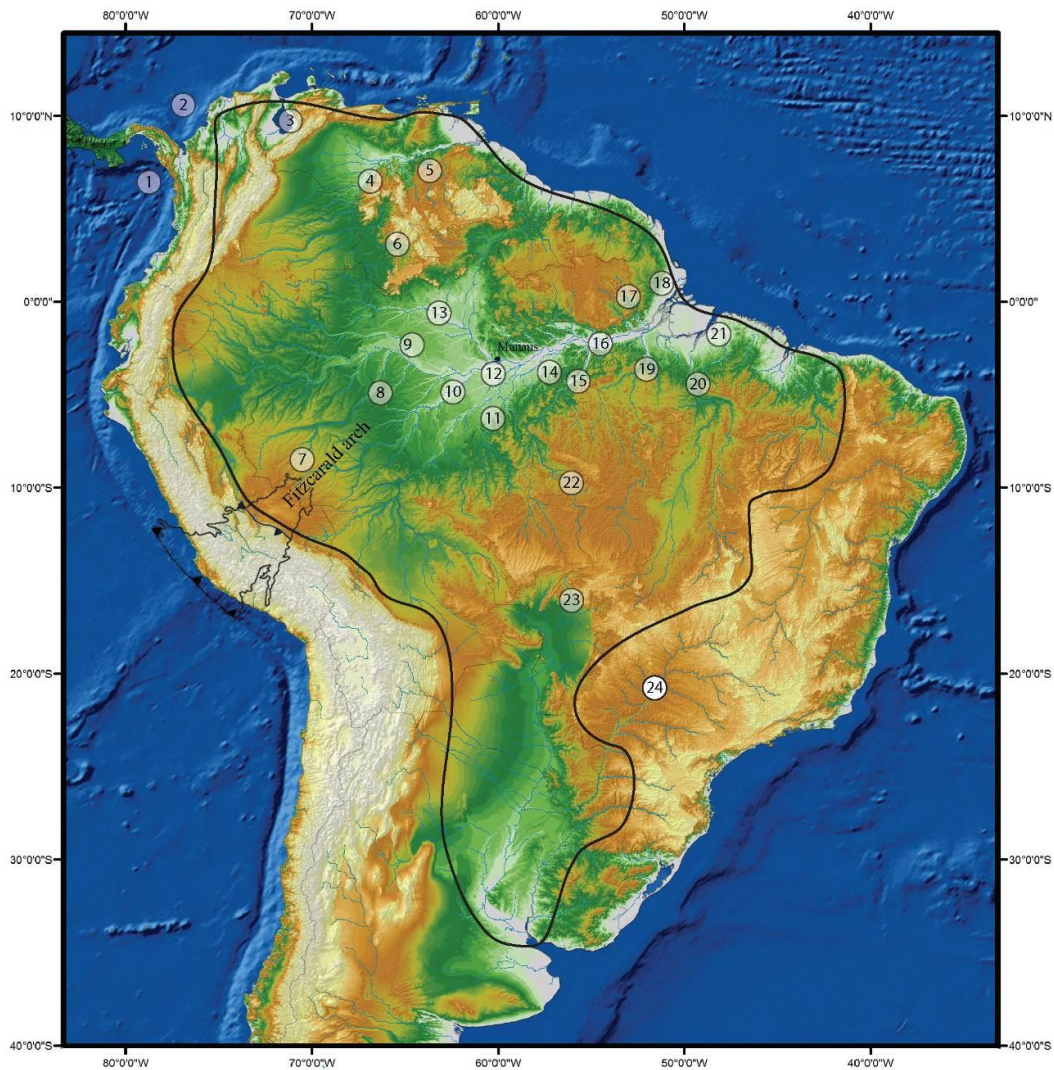
A região Neotropical contém a maior diversidade ictiofaunística do mundo (Reis *et al.*, 2003). Estudos recentes de biogeografia histórica de peixes de água doce da América do Sul demonstram que importante fase de diversificação ocorreu do Mioceno Tardio ao Pleistoceno entre ~ 11 e 2 Ma (Lovejoy e De Araújo, 2000; Sivasundar *et al.*, 2001; Montoya-Burgos, 2003; Hubert *et al.*, 2007). Esse período de diversificação coincide com o dinâmico desenvolvimento paleogeográfico e conseqüente alterações nas redes de drenagem da América do Sul, que vem ocorrendo pelo menos desde o Neógeno (Hoorn *et al.*, 1995; Horton e Decelles, 1997; Lundberg *et al.*, 1998; Rossetti *et al.*, 2005; Uba *et al.*, 2006; Espurt *et al.*, 2007; Sempere *et al.*, 2008; Mora *et al.*, 2010; Roddaz *et al.*, 2010; Wesselingh *et al.*, 2010).

Os peixes, devido a limitações fisiológicas, estão estritamente confinados aos cursos de água e, portanto, alterações nas redes de drenagem afetam diretamente o fluxo gênico entre populações. Eventos de dispersão seguidos por vicariância ocorrem em peixes quando da captura de redes de drenagem entre bacias hidrográficas por eventos geológicos e climáticos (Lundberg *et al.*, 1998; Montoya-Burgos, 2003; Hubert e Renno, 2006). Lundberg *et al.* (1998) propõem que parcela significativa da diversidade ictiológica neotropical tenha surgido por vicariância após mudanças nas redes de drenagem da América do Sul durante o Neógeno, a chamada hipótese hidrogeológica.

As arraias de água doce da família Potamotrygonidae formam um grupo monofilético (Rosa, 1985; Nishida, 1990; Lovejoy, 1996; Carvalho, M. R. D. *et al.*, 2004), cujo ancestral adaptou-se a ambientes de água doce no início do Mioceno após uma grande transgressão marinha a noroeste da América do Sul, em local onde hoje se situa, aproximadamente, o lago

Maracaibo (Lovejoy *et al.*, 1998). Espécies dessa família ocorrem nos principais sistemas de rios da América do Sul que drenam até o Oceano Atlântico e Mar do Caribe, com a exceção da bacia do rio São Francisco e drenagens costeiras a oeste e sul do rio Parnaíba (Rosa, 1985, Fig. 1.1). O fato do lugar e tempo de origem de Potamotrygonidae serem bem determinados faz desse grupo taxonômico um modelo para se entender a evolução paleogeográfica das redes de drenagem da América do Sul, uma vez que a ordem, idade dos eventos de cladogênese, e distribuição geográfica atual das espécies estão estreitamente relacionados com a conectividade, presente ou pretérita, entre os sistemas de rios que potencialmente puderam ser colonizados no período de existência do grupo.

Nesse capítulo farei um resumo sobre alguns dos principais eventos paleogeográficos discutidos na literatura que potencialmente influenciaram a diversificação de peixes neotropicais. Em seguida, apresentarei proposta de filogenia molecular das arraias da família Potamotrygonidae com estimativas de idades de cladogênese, bem como testes de variação na taxa de especiação ao longo da história evolutiva do grupo. Por fim farei uma correlação entre os resultados da filogenia e distribuição geográfica das espécies incluídas na análise com as mudanças paleogeográficas da América do Sul, com o objetivo de esclarecer a história evolutiva do grupo e corroborar algum(ns) evento(s) paleogeográfico(s) como importante na diversificação da fauna aquática Neotropical.



**Figura 1.1** Mapa da América do Sul colorido por altitude. Linha preta demarca distribuição geográfica da família Potamotrygonidae. Nazca ridge visível na placa de Nazca e sua projeção inferida sob a placa Sul-americana, originando o arco de Fitzcarraldo. Observe os cinturões sucessivamente com mais baixas altitudes no sentido SW-NE, a partir desse arco até o Rio Negro (ver texto). Áreas amostradas: 1. Pacífico, 2. Atlântico, 3. lago Maracaibo, rios 4. Parguaza 5. Caura, 6. Mavaca, 7. Tarauacá, 8. Juruá, 9. Jarauá, 10. Purus, 11. Aripuanã, 12. Médio Amazonas, 13. Negro, 14. Maués, 15. Tapajós (montante e

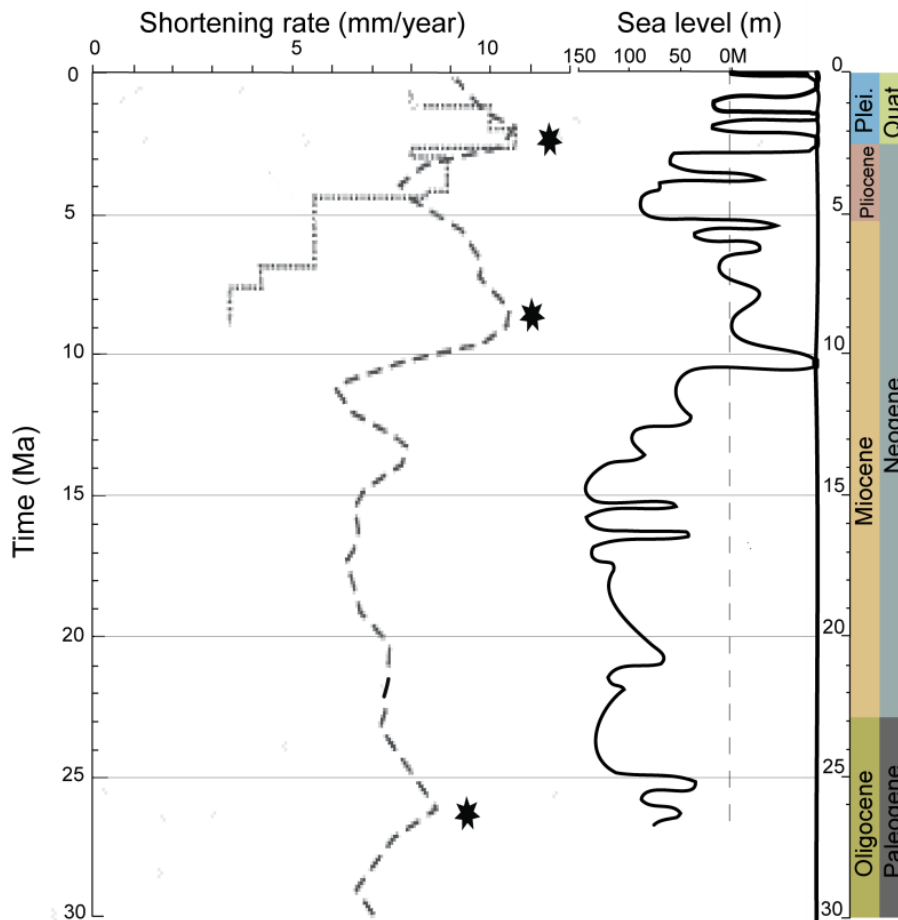
jusante de corredeiras), 16. Baixo Amazonas, 17. Jari, 18. Araguari, 19. Xingu, 20. Tocantins, 21. Boca Amazonas, 22. Azul, 23. Cuiabá, 24. Paraná.

## **Evolução Paleogeográfica da América do Sul no Neógeno com ênfase na Bacia**

### **Amazônica**

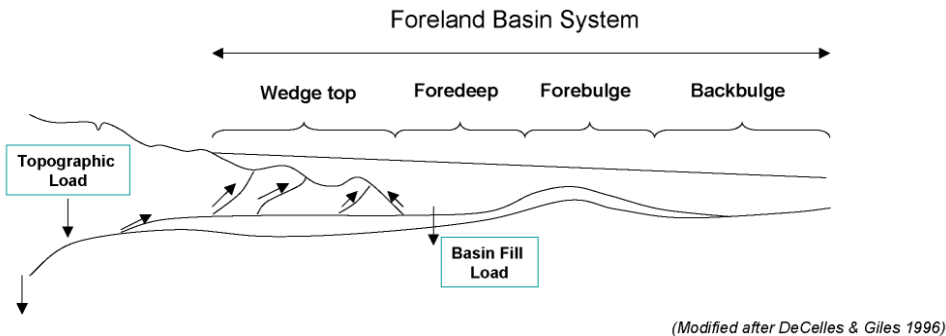
Eventos tectônicos no Neógeno estão entre os principais fatores que promoveram alterações nas redes de drenagem da Bacia Amazônica, formação de novas fronteiras entre as bacias hidrográficas, múltiplos eventos de captura de cabeceiras e fragmentação de ambientes de água doce por corpos de água salgada na América do Sul, particularmente da Bacia Amazônica (Lundberg *et al.*, 1998). O encontro convergente entre as placas Sul-Americana e de Nazca desencadeou stress compressional predominantemente horizontal orientado no sentido leste- oeste na parte cratônica da placa Sul-Americana (Zoback *et al.*, 1989; Assumpção, 1992; Lima, 2000). Esse estresse promoveu o soerguimento dos Andes no oeste da América do Sul (Sempere *et al.*, 2008) e possivelmente reativaram falhas pré-cambrianas intraplaca em regiões mais centrais da América do Sul, provocando movimentos como falhas do tipo transcorrente (*strike-slipe*) e soerguimento e rebaixamento de blocos (Costa *et al.*, 2001; Bezerra, 2003), resultando em, por exemplo, a migração da foz de tributários do Amazonas para o leste (e.g. rio Negro; Almeida-Filho e Miranda, 2007; rio Tocantins; Rossetti e Valeriano, 2007).

O soerguimento dos Andes até atingir sua forma de cadeia de montanhas atual provavelmente se deu em três pulsos, com ápices estimados há ~27, ~10 e ~2,1 milhões de anos atrás (Echavarria *et al.*, 2003, Fig. 1.2; Oncken *et al.*, 2006; Uba *et al.*, 2006). O



**Figura 1.2.** Diagrama ilustrando à esquerda o período de encurtamento e provável soerguimento dos Andes ao longo do tempo, compilado de Oncken *et al.* (2006) (linha tracejada) e Echevarria (2003) (linha pontilhada). As estrelas indicam os principais picos de encurtamento. À direita, curva eustática dos oceanos. Modificados de Uba (2006) e Haq (1987), respectivamente.

soerguimento dos Andes isolou bacias hidrográficas (e.g. Maracaibo e Magdalena) e a carga orogênica resultante causou o rebaixamento das áreas a oeste, por meio do desenvolvimento de sistema de bacia antepaís (*foreland*) do tipo retroarco compreendendo o que é hoje conhecida como Bacia Amazônica Oriental (Decelles e Giles, 1996; Horton e Decelles, 1997; Roddaz *et al.*, 2010). Fig. 1.3



**Figura 1.3** Sistema de Bacia Antepaís (*foreland*). Modificado de Decelles e Giles, 1996. Retirado do Wikipedia

O desenvolvimento de bacia antepaís a oeste da Cordilheira dos Andes soergueu arcos estruturais, comprovadamente o *forebulge* do Arco de Iquitos (Caputo, 1991; Roddaz, Baby, *et al.*, 2005) e rebaixou grandes extensões de terra que promoveram a formação de uma área alagada gigante ocupando o oeste amazônico, dominada por canais rasos, lagos de inundação e pântanos, proporcionando grande diversificação de fauna aquática adaptada a ambientes lacustres (Wesselingh *et al.*, 2002; Hoorn *et al.*, 2010). Apesar de muito menos estudadas (Rossetti *et al.*, 2005), regiões mais centrais da América do Sul também apresentaram dinâmica evolução tectônica no Neógeno, impulsionada por dois pulsos cinemáticos que alteraram significativamente a rede de drenagens da Bacia Amazônica, determinando a posição moderna dos rios (Lima, 2000; Costa *et al.*, 2001; Bezerra, 2003; Almeida-Filho e Miranda, 2007). Esses pulsos podem estar relacionados com o estresse



oriundo da compressão entre as placas Sul-americana e de Nazca (Assumpção, 1992; Roddaz, Baby, *et al.*, 2005), entretanto a ligação desses pulsos com o choque é incerto (Zoback *et al.*, 1989) e podem estar ligados ao soerguimento oriundo de transpressão por falha reversa como sugerido por Costa *et al.* (2001) e Rossetti (2003). A transgressão provavelmente ressoergueu antigos arcos estruturais como exemplificado por Caputo (2005) no Jurássico para o Arco de Carauari. O Arco do Purus se manteve como divisor das bacias do Solimões e Amazonas por todo o Neógeno até o estabelecimento do rio Amazonas transcontinental (Rossetti *et al.*, 2005; Wesselingh *et al.*, 2010), enquanto que evidências indiretas da presença do Arco de Carauari são sugeridas por Wilkinson *et al.* (2010). Esses arcos provavelmente funcionaram como barreiras vicariantes.

Aumentos no nível eustático dos oceanos também desempenharam papel importante na evolução das redes de drenagem da América do Sul no Neógeno. Devido à baixa altitude das planícies amazônicas, amplificada pela subsidência da bacia *antepaís* no Oeste amazônico, o aumento no nível do mar causou repetidas transgressões marinhas, e possivelmente represamento da boca de rios e consequente aumento do nível eustático dos rios ao longo do Neógeno (Irion *et al.*, 1997; Roddaz *et al.*, 2010).

Durante o Mioceno, entre 25-10 Ma, repetidos aumentos de mais de 100 m no nível do mar (Haq *et al.*, 1987; Fig. 1.2) provocaram grandes transgressões marinhas nas planícies do noroeste da América do Sul (Hovikoski *et al.*, 2010) e também na região compreendida hoje entre a foz do rio Amazonas até o Arco de Gurupá, há ~ 200 Km da região costeira (Rossetti, 2004 e referências lá incluídas). O número de vezes, extensão geográfica e duração dessas invasões ainda são debatidos. Aumento no nível eustático dos oceanos no Plioceno, entre 5 e 3 Ma de até ~100 m e aumento de ~25 m nos períodos interglaciais durante o Pleistoceno (Haq *et al.*, 1987) (Fig. 1.2) também podem ter causado transgressões marinhas (Nores,

1999; 2004). Alternativamente, como sugerido por Irion *et al.* (1995; Irion *et al.*, 1997; Irion e Kalliola, 2010), esse aumento do nível oceânico pode ter desencadeado o represamento da boca de rios, que assim transbordaram e inundaram suas margens, podendo ter formado um lago de água doce de até 100 km de largura e 2500 km de comprimento desde a foz do rio Amazonas.

As transgressões marinhas permitiram a adaptação de espécies de origem marinha à água doce (e.g. Lovejoy *et al.*, 1998; Hamilton, 2001; Lovejoy *et al.*, 2006; Cooke *et al.*, 2011) e, provavelmente, promoveram especiação por vicariância de espécies de água doce isoladas nas margens dos corpos de água salgada (Hubert e Renno, 2006). Inundações de água doce pode ter promovido dispersão entre drenagens, com posterior especiação por vicariância após abaixamento das águas (Hubert *et al.*, 2007).

O modelo de mudanças paleogeográficas da Bacia Amazônica ocorridas desde o Mioceno ao presente que é amplamente utilizado para explicar a diversificação de peixes segue basicamente a proposta de Lundberg *et al.* (1998) e se baseou numa compilação de trabalhos de sedimentologia e geologia à época de sua publicação. Entretanto, a ausência de datas radiométricas trazem incertezas quanto a idades absolutas (Wesselingh *et al.*, 2006), e as dimensões continentais da Bacia Amazônica fragilizam extrapolações de estudos restritos geograficamente, que se concentram em sua grande maioria no Oeste amazônico (Rossetti *et al.*, 2005; Campbell Jr. *et al.*, 2006).

Um aumento expressivo no número de estudos tem ocorrido na última década usando sedimentologia, imagens de satélite e reflexão sísmica e tem trazido nova luz ao entendimento da evolução da geologia da Bacia Amazônica no Neógeno (Bezerra, 2003; Echavarría *et al.*, 2003; Rossetti *et al.*, 2005; Oncken *et al.*, 2006; Uba *et al.*, 2006; Almeida-Filho e Miranda, 2007; Espurt *et al.*, 2007; Hoorn e Wesselingh, 2010). Parte de tais estudos

foram agrupados no livro **Amazonia: landscape and species evolution: A look into the past**, e o modelo de eventos a partir do Mioceno lá proposto, sintetizado em (Wesselingh *et al.*, 2010), será aqui resumido, adicionado de informações relevantes e às vezes conflitantes tirados de outros trabalhos, para o entendimento do padrão de diversidade e distribuição geográfica das arraias da família Potamotrygonidae.

De ~ 24-11,8 Ma

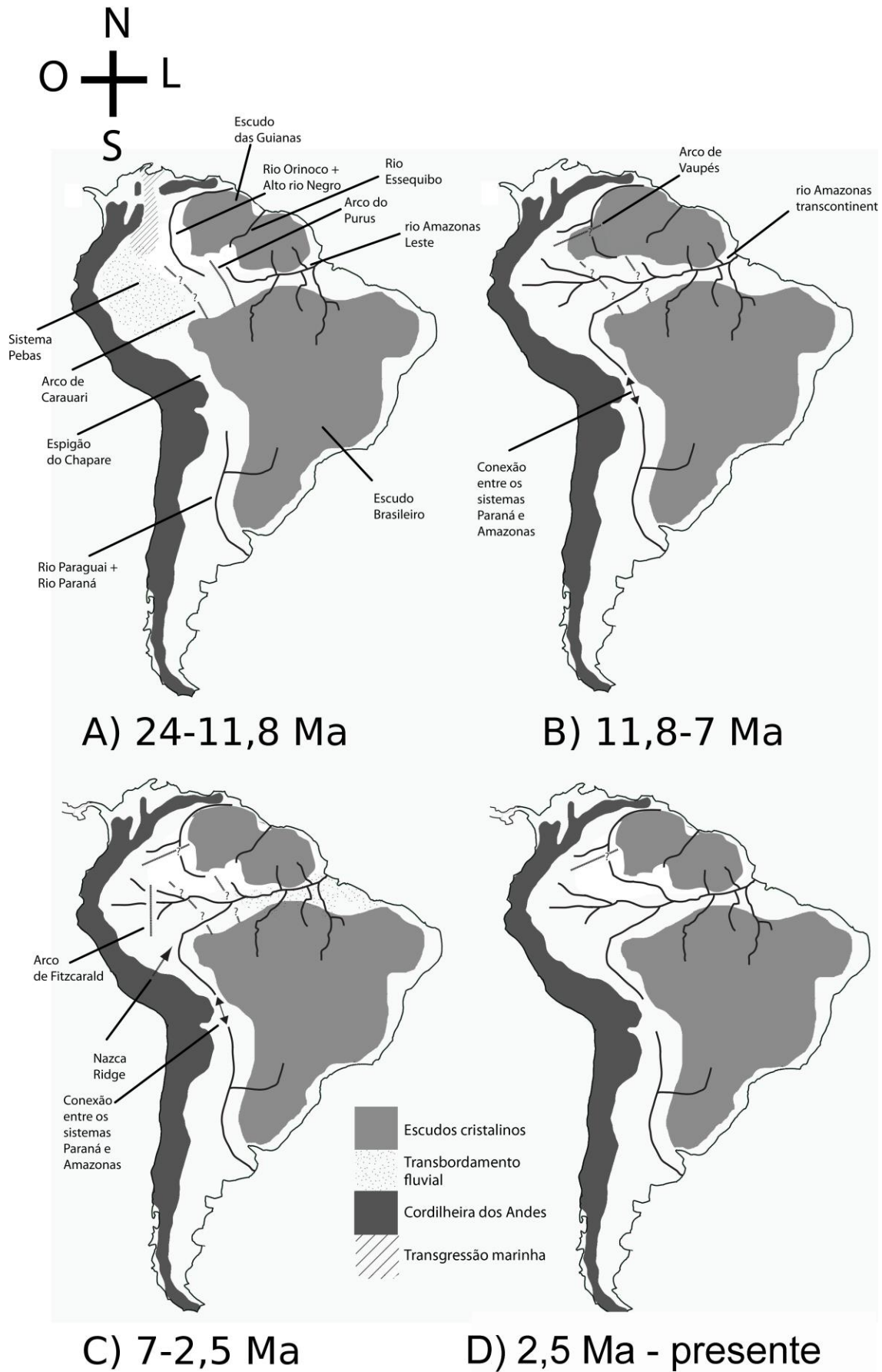
No fim do Oligoceno-início do Mioceno houve compressão e soerguimento dos Andes Centrais (Echavarría *et al.*, 2003, Fig. 1.4A; Uba *et al.*, 2006), com consequente subsidência a leste na bacia *antepaís* (Lundberg *et al.*, 1998). Uma formação sedimentar denominada Formação Pebas (formação Solimões no Brasil) foi depositada nesta bacia em área cobrindo 1 000 000 Km<sup>2</sup> no Oeste Amazônico de idade Mio-Pliocênica (Roddaz *et al.*, 2006, Fig. 1.4A; Wesselingh *et al.*, 2006) Existe muita controvérsia sobre quais condições ambientais prevaleciam quando essa formação se depositou, e várias hipóteses foram propostas (ver Wesselingh *et al.*, 2002e referências nela contidas). Atualmente a controvérsia está polarizada entre duas hipóteses. A primeira enuncia que a Amazônia ocidental era formada por um sistema fluvio-lacustre consistindo de lagos, pântanos, florestas e rios, com episódicas incursões marinhas, que cessaram após diminuição do nível do mar há ~10 Ma, parecido com o Pantanal atual, mas em escala muito maior (Figs. 1.2 e 1.4, Pebas mega-wetland; Hoorn, 1994; Hoorn e Vonhof, 2006; Kaandorp *et al.*, 2006; Roddaz *et al.*, 2006; Wesselingh, 2006; Wesselingh *et al.*, 2006; Hoorn *et al.*, 2010) A segunda hipótese é a de que o sistema Pebas consistia em um ambiente marinho influenciado por marés (Räsänen *et al.*, 1995; Gingras *et al.*, 2002;

Hovikoski *et al.*, 2005; Hoorn e Wesselingh, 2010). Hovikoski *et al.* (2007) analisando dados sedimentares e icnológicos concluem que repetidas incursões marinhas ocorreram na Amazônia Oriental por todo o Mioceno.

O sistema Pebas perdurou até pouco antes do estabelecimento do sistema amazônico moderno (Wesselingh, 2006) e era restrito à porção oeste da Bacia Amazônica até possivelmente o Arco de Carauari ou talvez o Arco de Purus. Esse arco era uma elevação de terra que separava a porção leste da oeste da Bacia Amazônica atual (Rossetti *et al.*, 2005; Hovikoski *et al.*, 2007; Mapes, 2009), sendo que a primeira drenava até o Atlântico a leste (aproximadamente onde o rio Amazonas atualmente desemboca); enquanto que a segunda drenava até o Atlântico a noroeste (Fig. 1.4A).

A localização do Arco do Purus frequentemente é atribuída à região próxima à cidade de Manaus, entretanto Mapes (2007), analisando idades de zircões, demonstrou ausência de sedimentos provenientes dos Andes próximo à cidade de Manaus, o que sugere que o Arco do Purus situava-se mais a oeste (ver sua Figura 4.1). Nessa posição o baixo curso do rio Negro estaria na porção leste da Bacia Amazônica, e, portanto isolado do sistema Pebas.

O curso atual do rio Negro parece ter se estabelecido muito recentemente no tempo evolutivo, evidenciado por paleocanais que sugerem migração a leste de sua foz (Franzinelli e Igreja, 2002; Almeida-Filho e Miranda, 2007) ; pela drenagem ainda pouco desenvolvida no Alto Negro, incluindo inúmeros paleocanais (Bezerra, 2003); e subsidência de área entre rio Negro e rio Branco (Bezerra, 2003; Rossetti *et al.*, 2005).



**Figura 1.4.** Evolução Paleogeográfica da América do Sul no Neógeno. Para explicação, ver Caixa 1.

**CAIXA 1****Evolução Paleogeográfica da América do Sul no Neógeno**

Após revisão bibliográfica, particularmente dos modelos de Lundberg, Bezerra e Rossetti proponho o modelo paleogeográfico abaixo. As letras são referentes à Fig. 1.4

A) Invasão marinha pelo norte; formação do Sistema Pebas no oeste, ora água doce, ora salgada. O Istmo do Panamá NÃO existia (onde hoje é a América Central - Sul. O Pebas era delimitado a leste, ou pelo Arco do Carauari, se tiver existido na época, ou o Arco do Purus, que fica mais a oeste do que Manaus e também que o Rio Negro. Talvez nessa época o Rio Negro NÃO se ligava ao Pebas. O Pebas era um grandíssimo Pantanal que era salobro ou até salgado em trechos mais ou menos grandes, muitas vezes, época em que se adaptaram a água doce uma arraia que veio do Caribe-Pacífico, e também a corvina ou pescada de água doce. Se o rio Negro tiver ficado separado do Pebas, suas águas já seriam pretas (cor de chá) e ácidas. Os peixes evoluíram ali, assim como todos os outros animais aquáticos, como carangueijos e camarões, o tetra-neón, o acará-bandeira do alto e baixo Negro, a arraia-cururu-pequena endêmica, das beiradas dos igapós (alagados) motoro do rio Negro, a tartaruga tracajá e o jacaré. A leste do Arco do Purus, os rios drenavam para o Atlântico Nordeste, próximo de

onde deságua hoje. B) As Cordilheiras de Mérida e Orientais soerguem e fecham a conexão com o mar. Em algum ponto pode ter soerguido a o Arco de Vaupés, separando parcialmente o Alto Orinoco do Alto rio Negro. Houve conexão com troca de fauna aquática, entre a Bacia do Alto Amazonas e a Bacia do rio Paraguai-Paraná. Houve reorganização de drenagem da Bacia Amazônica e possivelmente a inversão das águas da Bacia Amazônica Oeste com eventual transposição do Arco do Purus e deságue no Atlântico Nordeste (mas ver hipótese alternativa). C) Soerguimento do Arco de Fitzcarald no Oeste amazônico (seta). Fechamento e estabelecimento do Isto de Panamá. Transbordamento da água doce dos rios tributários do Baixo Amazonas, com posterior rebaixamento, e OUTRA conexão com troca de fauna aquática, entre a Bacia do Alto Amazonas e a Bacia do rio Paraguai-Paraná. D) Nova reorganização tectônica na Bacia Amazônica, talvez só agora a transposição do Arco do Purus, com o estabelecimento de volume e dinâmica de águas do passado próximo e atual. Grandes diminuições periódicas no nível das águas do Baixo Amazonas e tributários, causando escavação e conseqüente formação das *ria lakes*.

Algumas espécies de peixes que ocorrem no alto rio Negro são mais aparentados com táxons do Orinoco do que do baixo rio Negro (Hubert e Renno, 2006; Meliciano, 2008; Souza, 2008), sugerindo que o alto rio Negro era conectado ao alto Orinoco e desconectado do baixo rio Negro. Esse trecho de rio também pode ter estado conectado ao rio Essequibo e assim desembocava no Atlântico a norte da América do Sul (Rossetti *et al.*, 2005).

Em uma das transgressões marinhas no noroeste da América do Sul houve a adaptação do ancestral das arraias de água doce da família Potamotrygonidae a ambientes de água doce no início do Mioceno (Lovejoy *et al.*, 1998). Na época dessa transgressão a Cordilheira de Mérida, a Cordilheira Oriental e o Arco de Vaupés, que separam hoje as bacias do Magdalena e Maracaibo e as bacias do Orinoco e Amazônica respectivamente, ainda não haviam soerguido, de forma que o Lhanos formava uma grande planície interligada à Bacia Amazônica Oriental.

Com o soerguimento dos Andes centrais desenvolveu-se uma elevação de terra denominada de Espigão do Chapare (“*Chapare Buttress*”) que separou as planícies do rio Beni do Chaco, i.e., dividiu os sistemas Paraná e Amazonas . Esse evento ocorreu há, no mínimo, o início do Mioceno (~20 Ma, Lundberg *et al.*, 1998).

#### De ~ 11,8–7 Ma

Há ~11,8 Ma a Bacia do rio Magdalena ficou isolada devido ao soerguimento final da Cordilheira Oriental (Lundberg *et al.*, 1998, Fig. 1.4B).

Há ~ 11 Ma a fase miocênica Quechua II de soerguimento dos Andes começou nos Andes Centrais, atingindo ápice há ~10 Ma (Uba *et al.*, 2006; Fig. 1.2). Segundo Figueiredo (2009), o soerguimento dos Andes desencadeou o estabelecimento do rio Amazonas



transcontinental há ~ 11,8-11,3 Ma, baseado em dados bioestratigráficos, e isotópicos e dados de poços de perfuração na plataforma da foz da Bacia Amazônica. Estimativas oriundas de dados dos depósitos do Cone do Amazonas estão em concordância grosseira com essa estimativa (e.g. Dobson *et al.*, 2001; Harris e Mix, 2002 ~9 and 8 Ma respectivamente ). A inversão no sentido do rio Amazonas provavelmente ocorreu como resultado do preenchimento por sedimentos na Amazônia Oeste (*overflowing*) e consequente transposição do Arco do Purus (Hoorn, 1994; Hoorn *et al.*, 1995; Räsänen *et al.*, 1995; Wesselingh, 2006; Roddaz *et al.*, 2010). Entretanto, essa estimativa de idade é questionada por Campbell Jr. (2010), que argumenta que o estabelecimento do rio Amazonas moderno ocorreu há ~ 2,5 Ma, baseado em estimativa de idade absoluta de cinzas vulcânicas depositadas nos sedimentos mais jovens da formação Madre de Dios (Campbell Jr. *et al.*, 2001; Wesselingh *et al.*, 2006). Eles argumentam que a Bacia Amazônica funcionava como uma única bacia sedimentar no Neógeno tardio e que o estabelecimento do rio Amazonas ocorreu após a deposição da formação Madre de Dios (formação Içá no Brasil). Rossetti *et al.* (2005) também sugerem que o estabelecimento final do rio Amazonas ocorreu após a deposição da formação Içá, embora provavelmente tenha estimado erroneamente as idades absolutas, ao se basear em  $^{14}\text{C}$  (Irion e Räsänen, 2005; Wesselingh *et al.*, 2006).

A inversão do sentido do proto-Amazonas de Leste-Oeste para o sentido moderno Oeste-Leste é corroborado por estudo estratigráfico da formação Solimões em região compreendida entre as cidades de Tefé e Coari, aonde Vega (2006) infere rio correndo no sentido oeste-leste. Entretanto, esse rio apresenta foz em forma de leque desembocando em lago de proporções continentais (delta lacustre de mais de 30.000 Km<sup>2</sup>) a oeste do Arco do Purus, sugerindo que essa barreira persistiu isolando as Bacias amazônicas Leste e Oeste por algum tempo mesmo após a inversão do fluxo do proto-Amazonas. Vega (2006) sugere

que o Arco do Purus funcionou como barreira até pelo menos o Neo-Mioceno contestando a proposta do estabelecimento do Amazonas transcontinental no Meso-Mioceno e reforçando a hipótese de Rossetti *et al.* (2005) e Campbell Jr. *et al.* (2006) , uma vez que os depósitos estudados por Vega (2006) são sucedidos por depósitos da formação Içá.

A ausência de datação radiométricas no registro sedimentar da bacia amazônica traz incertezas quanto ao estabelecimento de correlações entre a sucessão de estratigráfica e idades absolutas na formulação da idade do estabelecimento do rio Amazonas transcontinental (Cooke *et al.*, 2011), particularmente quanto a utilização de biozonas de pólen para calibrar idades miocênicas (Latrubesse *et al.*, 2007). De qualquer modo, o soerguimento e união da Cordilheira Mérida, Cordilheira Oriental e Sierra del Perijá isolou o lago Maracaibo da bacia do Orinoco/Negro em algum ponto do Mioceno tardio há ~ 10-5 Ma (Audemard, 2003).

Durante o Mioceno tardio ou Plioceno, o soerguimento do Arco de Vaupés separou o sistema do Orinoco do sistema Amazônico. Dados termocronológicos se fazem necessário para refinar essa datação (Mora *et al.*, 2010). Entretanto, esses sistemas provavelmente nunca ficaram completamente isolados uma vez que ainda hoje se conectam pelo rio Cassiquiare (Lundberg *et al.*, 1998).

O soerguimento das Cordilheiras Centrais há ~ 10 Ma causou sobrepeso orogênico e consequente subsidência da bacia *antepaís* adjacente a leste (formação Yecua) acarretando mudança na drenagem da bacia de padrão transversal para axial (Uba *et al.*, 2006). Esse dobramento devido a subsidência e consequente não preenchimento total de sedimentos provavelmente resultou na conexão entre as bacias do Amazonas e Paraná há ~10 milhões de anos, com subsequente preenchimento por sedimentos, causando a captura de cabeceiras do sistema Paraná pelo sistema Amazonas, conforme proposto por Lundberg *et*

*al.* (1998). Foram encontrados três eventos de cladogênese entre espécies de peixes que ocorrem na Bacia Amazonas das do rio Paraguai dentro do gênero *Hypostomus* com datas estimadas entre 11,8 e 10 Ma, corroborando a conexão entre essas bacias, provavelmente devido à subsidência da bacia *antepaís* do Chaco (Montoya-Burgos, 2003).

### De ~ 7-2,5 Ma

Durante o Mioceno tardio-Plioceno, o *forebulge* do Arco de Iquitos soergueu-se em resposta ao *loading* orogênico dos Andes, criando duas redes de drenagens, a drenagem andina oeste, e a drenagem cratônica leste (Roddaz, Viers, *et al.*, 2005, Fig. 1.4C).

No Plioceno (~ 4 Ma) houve o soerguimento do Arco de Fitzcarraldo devido a subducção da Crista de Nazca (*Nazca Ridge*) sob a placa Sul-americana, dividindo a bacia Amazônica oeste em duas bacias subsidentes – a northern Amazonian *foreland* basin (NAFB) e a southern Amazonian *foreland* basin (SAFB) (Espurt *et al.*, 2007; Espurt *et al.*, 2010). A subducção da Crista de Nazca perturbou o manto abaixo da bacia Amazônica (ver figura 4 de Espurt *et al.*, 2007) criando carga adicional e pode ter desencadeado processos sedimentológicos e hidrológicos na bacia Amazônica (Espurt *et al.*, 2007). Rossetti *et al.* (2005) encontram, baseados em agrupamentos de minerais pesados, unidades sedimentares na forma de cinturões progressivamente mais jovens do sudoeste ao noroeste da bacia amazônica, sugerindo uma bacia em subsidência com depocentro, i.e. a área de maior profundidade, migrando em sentido sudoeste-nordeste até o Arco do Purus (figura 1 em Rossetti, ver nossa Fig. 1.1 com altitudes progressivamente menores nessa mesma orientação). Por meio de datação por <sup>14</sup>C eles dizem que a separação do Arco do Purus durou até o Pleistoceno, entretanto essas datas

provavelmente resultam de infiltração de camadas mais jovens (Irion e Räsänen, 2005; Campbell Jr. *et al.*, 2006).

O sentido sudoeste-nordeste observado por Rossetti *et al.* (2005) coincide com a direção da subducção da Crista de Nazca. Eu tentativamente sugiro que o aumento do loading e possivelmente o movimento do manto desencadeado pela subducção da Crista de Nazca (cf. Espurt *et al.*, 2007) tenha causado a subsidência progressiva da bacia amazônica no sentido sudoeste-noroeste, culminando com subsidência encontrada na região entre Rio Negro-Branco (ver Fig. 1.1), e possivelmente poderia estar ligado à transposição do Arco do Purus e o estabelecimento do Amazonas transcontinental. Entretanto, caso esse fosse o fator causal do estabelecimento do rio Amazonas, a transposição deveria ter ocorrido há menos de 4 Ma, muito mais recentemente que o proposto por Figueiredo *et al.* (2009), há ~ 11,8 e 11,3 Ma, mas compatível com hipóteses de (Rossetti *et al.*, 2005; Wesselingh *et al.*, 2006) e Vega (2006).

Entre 5 e 3 Ma houve aumento em mais de 80 a 100m no nível do mar (Haq, 1984, Fig. 1.2) podendo ter desencadeado transgressão marinha ou represamento e consequente aumento no nível dos rios com transbordamento. Essa segunda hipótese é fortemente corroborada por estudos de Irion *et al.* (1997), Irion & Kalliola (2010), Irion *et al.* (1995) Rossetti *et al.* (2005), que no entanto datam esses eventos para o Pleistoceno. Entretanto suas datações são baseadas em correlações por estratigrafia e datações por  $^{14}\text{C}$ , abertas a incertezas e estimativas erradas, e além disso o aumento do nível do mar no Pleistoceno foi bem menor que o do Plioceno (Fig.1.2).

O fechamento praticamente total, ou total, do Istmo do Panamá ocorreu há ~ 3,5-3,1 Ma, porém pode ter começado há ~6 Ma e pode ter se estendido até ~2,5 Ma (Molnar, 2008; Landau *et al.*, 2009).

Há ~2,5 Ma os Andes Centrais sofreram novo encurtamento (Fig. 1.2) e consequente soerguimento da protuberância flexural *forebulge* da bacia antepaís e subsidência do *foredeep*, possivelmente podendo ter havido outra conexão entre as bacias do Amazonas e Paraná-Paraguai (Uba *et al.*, 2006) nesse período (Fig. 1.4 C).

### De ~ 2,5 Ma ao presente

Há ~2,4 Ma começa alta taxa de sedimentação na plataforma da foz da bacia Amazonas, quando o rio Amazonas moderno se desenvolveu e a bacia Amazônica toma sua conformação atual (Mapes, 2009; Wesselingh *et al.*, 2010), embora, segundo Figueiredo *et al.* (2009), o rio Amazonas já havia se tornado transcontinental há ~11,8-11,3 Ma. Entretanto, Campbell *et al.* (2006) sugerem que o Amazonas transcontinental se forma há ~2,5 Ma após deposição da formação Içá. Rossetti (2005) também afirma que o rio transcontinental surge após formação Içá. O aumento na sedimentação do rio transcontinental ou alternativamente a transposição do Arco do Purus e então formação do rio transcontinental provavelmente estão ligados a grandes reorganizações das drenagens. Essas reorganizações podem estar ligadas a choque de placas há ~2,5 Ma (Fig. 1.1), ou ainda à contínua subsidência em sentido sudoeste-noroeste devido à subducção da Crista de Nazca até atingir região do Arco do Purus. Essas transformações podem ter desencadeado subsidência de região entre rio Negro - rio Branco, fazendo com que o rio Branco se desconectasse do rio Essequibo e ligasse ao rio Negro, bem como ter proporcionado ligação entre alto e baixo rio Negro e migração da boca do rio Negro para leste, configurando-se assim o rio Negro moderno (Bezerra, 2003). Outros eventos podem ter ocorrido como a migração a leste da foz do rio Tocantins (Rossetti e Valeriano, 2007).

Durante os ciclos glaciais pleistocênicos há maior erosão nos períodos glaciais, submersão nos aumentos do nível do mar e deposição nos períodos interglaciais. A foz de vários tributários de água clara do baixo Amazonas formam os lagos de barragem (*ria lakes*) devido ao não preenchimento de sedimentos erodidos nos períodos glaciais, e a baixa carga de sedimentos dos escudos cristalinos (Irion *et al.*, 1995, Tabela 1).

### **Arraias de água doce da família Potamotrygonidae**

As arraias de água doce da família Potamotrygonidae compreendem um grupo monofilético (Rosa, 1985; Nishida, 1990; Lovejoy, 1996; Espurt *et al.*, 2010) endêmico da América do Sul, estritamente eurifluvial com osmorregulação análoga a teleósteos (Wood *et al.*, 2002; Molnar, 2008; Duncan *et al.*, 2009; Landau *et al.*, 2009). O ancestral da família provavelmente adaptou-se a água doce após transgressão marinha do mar do Caribe no noroeste da América do Sul entre o fim do Oligoceno e início do Mioceno (Lovejoy, 1996; Lovejoy *et al.*, 1998).

A família Potamotrygonidae então se diversificou no que hoje se reconhece como 24 espécies descritas em quatro gêneros, *Paratrygon* (uma espécie), *Heliotrygon* (duas espécies), *Plesiotrygon* (duas espécies) e *Potamotrygon* (19 espécies) (Carvalho *et al.*, 2003; Deynat, 2006; Rosa *et al.*, 2008; Carvalho e Lovejoy, 2011; Carvalho *et al.*, 2011; Carvalho e Ragno, 2011; Silva e Carvalho, 2011), ocorrendo nos principais sistemas de rios da América do Sul que drenam até o Oceano Atlântico e Mar do Caribe, com a exceção da bacia do rio São Francisco e drenagens costeiras a oeste e sul do rio Parnaíba (Rosa, 1985, Fig. 1). Entretanto a taxonomia do grupo não é bem resolvida, com ao menos cinco espécies novas que estão em descrição e algumas espécies consideradas taxonomicamente dúbias, espécies essas que apresentam grande policromatismo intraespecífico e sobreposição

interespecífica de caracteres merísticos e de coloração (Carvalho *et al.*, 2003; Toffoli *et al.*, 2008; Carvalho e Silva, 2011).

Tabela 1.1 Resumo de eventos paleogeográficos da América do Sul com potencial de influenciar na diversificação da fauna aquática

<b>Mudanças hidrogeológicas</b>	<b>Data (Ma)</b>	<b>Referências</b>
<b>Incursões marinhas no noroeste da América do Sul</b>	25-10	(Hoorn, 1994) (Räsänen <i>et al.</i> , 1995) Hoorn <i>et al.</i> (2010)
<b>Isolamento da Bacia do Magdalena do paleo Amazonas-Orinoco</b>	11,8	(Lundberg <i>et al.</i> , 1998)
<b>Isolamento do Lago Maracaibo do paleo Amazonas-Orinoco</b>	10-5	(Campbell Jr. <i>et al.</i> , 2001)
<b>Isolamento da Bacia do Orinoco da Bacia Amazônica</b>	10-3?	(Mora <i>et al.</i> , 2010)
<b>Conexão entre os sistemas Paraná e Amazonas</b>	10	(Lundberg <i>et al.</i> , 1998) (Uba <i>et al.</i> , 2006)
<b>Soerguimento do Arco de Iquitos</b>	10-3	(Roddaz, Viers, <i>et al.</i> , 2005)
<b>Soerguimento do Arco de Fitzcarraldo</b>	4	(Irion e Räsänen, 2005; Espurt <i>et al.</i> , 2007)
<b>Transbordamento de rios e alagamento devido aumento eustático dos oceanos</b>	5-3	(Haq <i>et al.</i> , 1987) (Irion <i>et al.</i> , 1995) (Irion <i>et al.</i> , 1997) (Rossetti <i>et al.</i> , 2005) (Irion e Kalliola, 2010)
<b>Fechamento do Istmo do Panamá</b>	6-2,5	(Latrubesse <i>et al.</i> , 2007) (Audemard, 2003)
<b>Conexão entre os sistemas Paraná e Amazonas</b>	2,5	(Rossetti e Valeriano, 2007) (Echavarria <i>et al.</i> , 2003) (Uba <i>et al.</i> , 2006)
<b>Reorganização das drenagens da Bacia Amazônica, transposição do Arco do Purus* e estabelecimento do rio Amazonas transcontinental*</b>	2,4	(Bezerra, 2003) (Rossetti <i>et al.</i> , 2005) (Wesselingh <i>et al.</i> , 2006)
<b>Ciclos de cheia e erosão nos tributários do baixo Amazonas</b>	3- presente	(Irion <i>et al.</i> , 1995) (Irion <i>et al.</i> , 1997) (Rossetti <i>et al.</i> , 2005) (Irion e Kalliola, 2010)

### ***Variação na taxa de especiação – a Radiação***

Após a colonização de novas áreas geográficas, novas zonas adaptativas livres de predadores ficam disponíveis, nas quais se espera um rápido aumento na taxa de especiação acompanhada de novas inovações-chave, de acordo com a hipótese da oportunidade ecológica (Schluter, 2000). De maneira similar, múltiplos eventos vicariantes ocorrendo em curto espaço de tempo podem gerar aumento na taxa de especiação (Kozak *et al.*, 2006).

As complexas mudanças paleoambientais sofridas na América do Sul geraram novas oportunidades ecológicas, com diferentes habitats a serem colonizados (e.g., formação de sistemas de lagos; rios de águas claras drenando escudos cristalinos e rios de águas brancas, ricas em sedimentos em suspensão oriundos dos Andes (Sioli, 1984), bem como pode ter gerado vários eventos vicariantes (por exemplo, ciclos de inundação seguidos de abaixamento das águas no Plioceno/Pleistoceno (Irion *et al.*, 1995) ou migração de rios no desenvolvimento de megaleques (“*megafan*”) (Wilkinson *et al.*, 2010), que são cones de sedimento que se acumulam quando o rio atinge área aberta de baixa angulação.

Podemos usar de filogenias para estimar variação na taxa de especiação, sendo que métodos atuais podem ser divididos em duas classes; métodos baseados na topologia e métodos temporais (Mooers e Heard, 1997; Barraclough e Nee, 2001). Métodos baseados na topologia ignoram informação do comprimento dos ramos, focando na diversidade relativa de dois (ou mais) grupos descendendo de um nó em comum (chamado de balanço ou simetria da árvore). Métodos temporais utilizam informação do comprimento dos ramos para estimar o tempo (“*timing*”) de eventos de especiação ao longo do tempo e comparar a distribuição do eventos observados ao longo do tempo com os esperados sob um modelo



nulo de cladogênese (Chan e Moore, 2002).

Nesse trabalho, proponho uma hipótese de filogenia molecular das arraias da família Potamotrygonidae com estimativas das idades dos eventos de cladogênese; e utilizo métodos baseados na topologia e no comprimento dos ramos proporcionais ao tempo para determinar se houve variação na taxa de diversificação durante a história evolutiva de Potamotrygonidae. Em seguida, correlaciono os resultados obtidos a partir da filogenia com informações sobre a distribuição geográfica das espécies analisadas e com o modelo de Evolução Paleogeográfica da América do Sul, a fim de propor modelo de biogeografia histórica de Potamotrygonidae e também fornecer evidências que suportem hipóteses de eventos paleogeográficos que influenciaram na diversificação da fauna aquática da América do Sul já propostos na literatura.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Propor modelo de biogeografia histórica para a família Potamotrygonidae e trazer suporte para alguns modelos alternativos de eventos paleogeográficos que influenciaram na diversificação da fauna aquática da América do Sul já propostos na literatura a partir dos dados moleculares de Potamotrygonidae aqui analisados.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Propor hipótese filogenética para a família Potamotrygonidae baseada em sequências de fragmentos de genes mitocondriais (ATPase e COI) e nuclear (RAG1).
- Testar se houve variação na taxa de diversificação ao longo da história evolutiva da família Potamotrygonidae.
- Correlacionar, qualitativamente, resultados da filogenia inferida e testes de diversificação com a distribuição espacial das espécies analisadas, de forma a embasar a proposta de um modelo de biogeografia histórica da família Potamotrygonidae

### 3. Material e métodos

#### *Amostragem dos táxons*

Foram amostrados 110 indivíduos da família Potamotrygonidae pertencentes a 10 das 23 espécies descritas da família (Carvalho *et al.* 2003) incluindo os 4 gêneros (*Potamotrygon*, *Paratrygon*, *Heliotrygon* e *Plesiotrygon*); 2 espécies em descrição do gênero *Potamotrygon*, sendo uma endêmica do rio Negro, aqui denominada de *Potamotrygon* sp.1 (Araújo, com.pess., Toffoli *et al.* 2008) e outra endêmica do rio Tapajós à montante de corredeiras próximas a cidade de Itaituba, com padrão de cor similar a *Potamotrygon motoro*. Essa espécie foi chamada de *Potamotrygon* sp. 2 (Toffoli *et al.*, 2008, Fig. 1.5).

Também foram analisados neste estudo 5 morfotipos coletados pelo autor cuja posição taxonômica ainda é incerta. O primeiro morfotipo foi denominado *Potamotrygon* sp. azul, coletado simpatricamente com *Potamotrygon* sp. 2. O segundo morfotipo foi denominado de *P. sp. assacu*, tendo sido um espécime coletado no rio Jari e um no rio Araguari, apresentando padrão de cor característico. O terceiro morfotipo foi chamado de *P. sp. marajo*, coletado no rio Araguari também um padrão de cor distinto, apresentando ocelos similares a *P. motoro* porém rodeados por anéis escuros, de certo modo similares a *P. orbigny*. O quarto morfotipo (*P. aff. scobina*) é similar quanto a morfologia e padrão de coloração a *P. scobina* mas sua localização geográfica está fora da distribuição geográfica conhecida para a espécie. Foi coletado um indivíduo no rio Aripuanã, um tributário do rio Madeira, dois no rio Caura e um no rio Mavaca (Bacia do Orinoco). O quinto morfotipo foi denominado *P. aff. schroederi* e foi coletado no rio Cassiquiare (rio que conecta as bacias do

Amazonas e Orinoco).

As espécies irmãs *Himantura pacifica* e *Himantura schmardae*, grupo-irmão de Potamotrygonidae (Lovejoy, 1996; Mceachran *et al.*, 1996; Dunn *et al.*, 2003) e as mais distantemente relacionadas *Himantura borneo* foram usadas como grupo externo.



*Paratrygon aiereba*

*Heliotrygon rosai*

*Plesiotrygon iwamae*

*Potamotrygon schroederi*



*Potamotrygon sp. 1*

*Potamotrygon henlei*

*Potamotrygon sp. 2*

*Potamotrygon orbignyi*



*Potamotrygon motoro*

*Potamotrygon scobina*

*Potamotrygon leopoldi*

*Potamotrygon falkneri*



*Potamotrygon sp. teles*

*Potamotrygon sp. assacu*

*Himantura schmardae*

*Himantura pacifica*

**Figura 1.5.** Espécies e morfotipos estudados.

### ***Distribuição geográfica dos táxons analisados***

A identificação das espécies foi baseada nos critérios morfológicos estabelecidos por Rosa (1985). Devido às incertezas taxonômicas foram amostrados indivíduos da mesma espécie em diferentes localidades geográficas (Tabela 1.2, Fig. 1.1).

*Paratrygon aiereba* habita os canais principais de rios das bacias amazônicas e do Orinoco e é uma das maiores dentre as espécies da família (junto com espécie *Potamotrygon brachyura* (até 100 cm, mais de 25 Kg). *Heliotrygon rosai* ocorre na calha principal do rio Amazonas. *Plesiotrygon iwamae* ocorre na calha principal do rio Amazonas. *Potamotrygon yepezi* é endêmica do lago Maracaibo, Venezuela. *Potamotrygon schroederi* ocorre nas bacias do rio Negro e Orinoco. *Potamotrygon* sp. 1 é endêmica da bacia do rio Negro. *P. motoro* apresenta ampla distribuição na América do Sul, *P. orbignyi* apresenta ampla distribuição na bacia Amazônica. Apesar da distribuição geográfica de *P. scobina* ser conhecida do baixo rio Amazonas e tributários do baixo Amazonas, foram coletados espécimes com padrão de cor (rosetas) e forma similares em outros rios (rio Aripuanã, tributário do Madeira, que é tributário do médio Amazonas; rios Caura e Mavaca (bacia do Orinoco). *P. falkneri* ocorre na bacia dos rios Paraná-Paraguai sendo que no rio Paraná ocorria historicamente a jusante das cachoeiras Sete-Quedas, mas após construção da barragem de Itaipu no ano de 1982 colonizaram à montante por meio de corredores para peixes colonizando a bacia do alto Paraná e tributários (Neto *et al.*, 2007). *Potamotrygon* sp. 2 e *P. sp. azul* ocorrem à montante de corredeiras próximas à cidade de Itaituba, no rio Tapajós e tributários. *P. henlei* ocorre à montante de corredeiras do rio Tocantins próximas a cidade de Marabá na bacia Tocantins-Araguaia. *P. leopoldi* ocorre à montante de corredeiras do rio Xingu próximas a cidade de Altamira. *P. sp. assacu* coletada no rio Araguari e Jari, *P.*

*sp. Marajo* coletada no rio Araguari.

Os indivíduos foram amostrados com espinhel, redes, redes de arrasto, arpão, vara de pesca. Foi amostrado tecido muscular da região ventral dos espécimes. Os tecidos estão armazenados na coleção do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) da Universidade Federal do Amazonas. A maioria dos indivíduos foram fotografados.

**Tabela 1.2** Localidade das espécies/morfotipos amostrados (numeradas conforme Fig.1.1).

<b>Espécie/morfotipo</b>	<b>Localidade</b>
<i>Heliotrygon rosai</i>	16. Baixo Amazonas
<i>Himantura pacifica</i>	1. Pacífico
<i>Himantura schmardae</i>	2. Atlântico
<i>Paratrygon aiereba</i>	11. Aripuanã 13. Negro
<i>Potamotrygon falkneri</i>	23. Cuiabá 24. Paraná
<i>Potamotrygon henlei</i>	20. Tocantins (à montante do bico do Papagaio)
<i>Potamotrygon leopoldi</i>	19. Xingu
<i>Potamotrygon motoro</i>	4. Parguaza 7. Tarauacá 8. Juruá 9. Jarauá 10. Purus 11. Aripuanã 12. Médio Amazonas 13. Negro 15. Tapajós (à jusante de Itaituba) 16. Baixo Amazonas 17. Jari 18. Araguari
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	7. Tarauacá 11. Aripuanã 13. Negro 14. Maués 15. Tapajós (à jusante de Itaituba) 17. Jari 19. Xingu
<i>Potamotrygon schroederi</i>	13. Negro
<i>Potamotrygon aff. schroederi</i>	25. Cassiquiare
<i>Potamotrygon scobina</i>	17. Jari 21. Boca Amazonas
<i>Potamotrygon aff. scobina</i>	5. Caura 6. Mavaca 11. Aripuanã
<i>Potamotrygon sp. 1</i>	13. Negro
<i>Potamotrygon sp. 2</i>	15. Tapajós (à montante de Itaituba) 22. Azul
<i>Potamotrygon sp. assacu</i>	17. Jari 18. Araguari
<i>Potamotrygon sp. azul</i>	22. Azul
<i>Potamotrygon sp. marajo</i>	18. Araguari
<i>Potamotrygon yepezi</i>	3. lago Maracaibo

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

Foram sequenciadas porções de dois genes mitocondriais (citocromo oxidase, COI; e ATP desidrogenase subunidades 6 e 8, ATPase) e um gene nuclear (recombination-activating gene 1; RAG1) para todos os táxons.

O DNA genômico total foi extraído usando protocolo padrão de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB). Os genes mitocondriais foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers específicos desenvolvidos para esse trabalho (tabela 1.2). As reações de amplificação foram realizadas em um volume de reação de 15  $\mu$ l, contendo 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; 1,5 $\mu$ l de tampão 10X com KCl (Fermentas); 1 mM de dNTPs; 0,2  $\mu$ M de cada *primer*; 1U da *Taq* DNA polimerase e 1  $\mu$ l de DNA (ca. 20ng). Os ciclos de amplificação foram realizados como segue: 1 ciclo de desnaturação a 93 °C por 1 minuto; 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 45 segundos; hibridação a 52 °C por 35 segundos; e extensão a 72 °C por 45 segundos. Uma extensão final foi realizada a 72 °C por 7 minutos. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose a 1% e purificado com PEG 8000 de acordo com protocolo de (Lis e Schleif, 1975), posteriormente ressuspendido em 15 $\mu$ l de água. A amplificação do fragmento do RAG1 foi feita com uma *nested* PCR (PCR aninhada), sob as mesmas condições dos genes mitocondriais, com exceção de que a temperatura de



**Tabela 1.3** Primers utilizados nesse estudo. (F) e (R) representam *forward* e *reverse*, respectivamente.

Locus	Nome	Sentido	Sequ	T (°C)
<b>COI</b>	COIf.1	F	CTTAACACAACWTTCTTTGACCC	52
	COIr.3	R	ACGTTTTGATGCRAAKGCYTCTC	52
<b>ATPase</b>	PotaATPf3_Lys	F	GTCCAGCATTAGCCTTTTAAGC	52
	PotaATPr3	R	CTGGGGTCAACTATRTGATATG	52
<b>RAG1</b>	Rag1.HB.F.L1	F	CCWGCTGTITGYTGGCCATIMG	50
	Rag1.Mart.R6	R	GTGTAGAGCCARTGRTGYTT	50
	Rag1.Potaf.2	F	TGCATTGAYGATTACCCAMTGA	53
	Rag1.Potar.1	R	GCTTTTGGACTGCCTTGCRITTCAT	53

hibridação na primeira rodada foi de 50<sup>0</sup>C e na segunda de 53<sup>0</sup>C, e para ambas as rodadas a etapa de extensão durou 2 minutos.

Os amplicons foram sequenciados com os primers *forward* para os genes mitocondriais enquanto que o fragmento RAG1 foi sequenciado em ambas as direções. Os amplicons foram sequenciados com protocolo do ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, como indicado pelo fabricante. O produto fita simples resultante foi corrido em um sequenciador automático AB3130xl na empresa Macrogen Inc. (Coréia do Sul).

### ***Análise das seqüências***

Alinhamentos múltiplos iniciais das seqüências das diferentes espécies foram realizados no ClustalW (Thompson *et al.* 1996) implementado no programa Bioedit 7.0.9.0 (Hall 1999) e posteriormente editadas manualmente. O comprimento das seqüências

alinhas foi de 500 bp (ATPase), 736 bp (COI) and 1235 bp (RAG1). Indels foram codificados como dados ausentes (*missing data*). O alinhamento completo foi traduzido em aminoácidos prováveis para verificação de códons de parada inesperados no programa MEGA 3.0

### ***Análise filogenética***

Árvores filogenéticas foram inferidas pelos critérios de máxima verossimilhança (ML), usando o programa Treefinder (Jobb *et al.*, 2004), e pelo critério de Inferência Baiesiana (BI) implementada no programa MrBayes ver. 3.0 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Em ambos os critérios foram reconstruídas árvores concatenando os três genes. Gadagkar *et al.* (2005) demonstrou que a concatenação de dois ou mais loci aumentam a acurácia de inferências filogenéticas. Essa melhora deve-se ao aumento do número absoluto de mutações dando suporte a ramos com poucas mudanças evolutivas e pela diminuição da variância dos parâmetros estimados.

Os modelos mais apropriados de substituição DNA para reconstruir as relações de Potamotryonidae sob ML foram determinados no programa Treefinder, baseado no critério de informação de Akaike (*Akaike Information Criterion*), permitindo a busca da árvore ML com profundidade de procura ("*search depth*") igual a 2. Essa árvore foi usada como modelo central de árvore ("*center tree*") para encontrar 5 outras árvores a 5 passos de distância da árvore central de acordo com o *nearest-neighbor-interchanges* (NNI) de forma a tentar evitar picos ótimos locais de ML. Em seguida foi feita uma procura de árvore global para encontrar a melhor árvore ML. O suporte dos nós foi estimado por 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*.

A seleção do modelo de substituição nucleotídica para cada gene (ATPase, COI, RAG1) sob critério BI baseou-se no AIC no programa MrModeltest 2.3 (Nylander,

2004). Os dados do COI e RAG1 foram particionados por códon. O fragmento de ATPase não foi particionado porque apresenta duas subunidades ATPase 6 e 8 que apresentam sobreposição na fase de leitura. Indels foram codificados como dados ausentes.

A análise Bayesiana foi feita com duas réplicas de 30 milhões de passos cada, amostradas a cada 3000 passos. Cada análise foi realizada com quatro correntes e valores *default* para os *priors*. Plots dos *log-likelihoods* ao longo do tempo foram avaliados quanto a estacionariedade no Tracer 1.4 (Drummond e Rambaut, 2007) e 15% das árvores foram descartadas como *burn-in*.

### ***Estimativa de datas de divergência***

Eventos geológicos de idade determinada foram usados como pontos de calibração. A cordilheira de Mérida iniciou soerguimento em algum ponto do Mioceno Tardio ~ 10-5 Ma (Campbell Jr. *et al.*, 2001) isolando o lago Maracaibo da bacia do Orinoco/Negro. Em estudos que usam esse ponto de calibração para estimativa de relógio molecular frequentemente usa-se a data de ~ 8 Ma (Lundberg *et al.*, 1998; p.40 e referências contidas). O fechamento praticamente total, ou total, do Istmo do Panamá ocorreu há ~ 3,5-3,1 Ma, porém tem ocorrido continuamente desde ~6 Ma e pode ter se estendido até ~2,5 Ma (Audemard, 2003; Latrubesse *et al.*, 2007) promovendo vicariância de organismos aquáticos de acordo com seu modo de vida (Knowlton *et al.*, 1993) . A separação de *Himantura pacifica* e *H. schmardae* provavelmente deve-se ao isolamento de populações do ancestral devido ao fechamento do Istmo do Panamá (Lovejoy *et al.* 1998).

Idades absolutas de divergência foram estimadas por método mcmc conforme Drummond *et al.* (2006) no programa BEAST 1.6.2 (Drummond e Rambaut, 2007). A

vantagem em se co-estimar filogenia e tempos de divergência é a possibilidade de acomodar a incerteza quanto à topologia da árvore e colocar distribuição de *priors* no tempo de divergência de acordo com conhecimento prévio. As idades foram calculadas para uma árvore contendo sub-amostragem dos táxons, com um indivíduo por espécie/morfotipo. A árvore inicial de input para o BEAST foi estimada por ML no Treefinder e transformada em cronograma no r8s (Sanderson, 2002) no qual o parâmetro *smoothing* foi ajustado por validação cruzada.

Para estimativa de idades absolutas no programa BEAST 1.6.2, foi utilizado como *priors* para pontos de calibração a separação entre *P. yepezi* e *P. schroederi* como distribuído normalmente com média de 8 Ma e 0,7 desvio-padrão. Para a separação entre *H. pacifica* e *H. schmardae* foi usado *prior* com média em 3,5 Ma e 0.5 desvio-padrão. O parâmetro de taxa de substituição foi independentemente estimado para cada gene, enquanto que a árvore foi considerada como única e forçada ao relógio molecular estrito. Estimativas de filogenia usando relógio molecular estrito apresentam maior precisão (menor tamanho esperado no 95% intervalo de confiança) e devem ser usadas quando a árvore comporta-se próximo ao relógio estrito (Drummond *et al.*, 2006). A análise foi corrida por 10 milhões de passos amostrados a cada 1 mil; a amostragem dos parâmetros foi checada no programa Tracer 1.4 para verificar se atingiu estacionaridade e se foram suficientemente amostrados. A análise foi corrida por duas vezes para checar para convergência. As árvores foram sumarizadas sob critério da regra da maioria no programa Treeannotator 1.6.2.

### ***Estimativa de taxa de diversificação***

Variação na taxa de diversificação é detectada por desbalanço na árvore (Chan e

Moore, 2002). Para medir se houve variação na taxa de diversificação dentro da história de Potamotygonidae foram calculados os índices de Colless (Ic, Colless, 1982) e Sackin (Shao, 1990; Mooers e Heard, 1997) implementados no programa apTreeshape 1.4-5 para testar se a topologia de Potamotrygonidae se ajusta às expectativas geradas sob o modelo de crescimento a taxas iguais de Yule. Para tal foi utilizada a mesma árvore consenso usada para datação mas colapsados ramos com suporte abaixo de 70% de valores de bootstrap a partir de 500 bootstraps. O desbalanço na árvore também pode advir de amostragem incompleta e dependendo da forma como politomias são resolvidas. Devido à ampla amostragem ao longo da distribuição da família, consideramos que espécies não amostradas foram aleatoriamente omitidas, o que não introduz enviesamento nas análises de balanço da topologia (Moore *et al.*, 2004). As politomias foram resolvidas aleatoriamente simulando um modelo de Yule por 1000 vezes. Foram computados os índices de Colless e Sackin para cada uma das 1000 resoluções. A significância estatística foi gerada por meio de simulação Monte Carlo de 1.000 árvores do mesmo tamanho que a árvore de Potamotrygonidae gerada sob modelo de Yule.

Para visualizar se houve variação na taxa de especiação ao longo do tempo a partir da informação do comprimento dos ramos, foi gerado um gráfico *lineage-through-time plot* (LTT) (Nee *et al.*, 1992) da árvore ultramétrica obtida no programa BEAST 1.6.2. Para testar se a curva empírica é compatível com um modelo constante na taxa de especiação (CR), primeiro foi comparado *por likelihood ratio test* se árvore empírica é significativamente mais compatível com CR sob um modelo *birth-death* do que sob um modelo de *pure-birth* no programa APE 3.0 (Paradis *et al.*, 2004). Uma vez que o modelo *birth-death* não é significativamente mais provável que *pure-birth* ( $p = 0,17$ ), foram simuladas 1000 árvores evoluindo sob o modelo CR por *pure-birth* com  $\lambda$  que mais se ajusta à árvore empírica

estimada para Potamostrygonidae, contendo 30 táxons (número total estimado de espécies de potamostrigónídeos) e podada aleatoriamente para 15 táxons (número de espécies/morfotipos amostrados). Espera-se que árvores exibindo aumento nas taxas de especiação durante parte de sua história (ou diminuição nas taxas de extinção) produza LTT plots côncavos, enquanto que árvores exibindo diminuição nas taxas de especiação (ou aumento nas taxas de extinção) devem produzir um plot LTT convexo (Pybus e Harvey, 2000; Schluter, 2000). As árvores foram simuladas no programa TreeSim 1.7 (Stadler, 2012) com o comando `sim.bd.taxa.age` estabelecendo a idade do MRCA igual ao estimado para árvore empírica. As árvores simuladas foram usadas para calcular o intervalo de 95% de confiança de taxa de especiação constante. Para testar desvios significativos do modelo CR, nós calculamos a estatística gamma ( $\gamma$ ) de Pybus e Harvey (2000) para saber se houve uma aceleração ou diminuição na taxa de especiação ao longo da história de Potamostrygonidae. Essa estatística indica se os nós internos estão mais próximos da raiz ou das pontas da árvore mais que o esperado sob modelo CR ( $\gamma=0$ ). Valores negativos de  $\gamma$  indicam que a maioria dos eventos de ramificação ocorreram principalmente nos ramos mais profundos da árvore e valores positivos indicam que as separações tenderam a ocorrer mais próximas das pontas da árvore. Amostragem de taxa incompleta pode enviesar o cálculo da estatística  $\gamma$  aumentando o erro tipo I. Assim calculamos a estatística  $\gamma$  para as mesmas árvores simuladas no LTT para gerar um intervalo de 95% de confiança (teste MCCR, Mooers e Heard, 1997).

Para identificar se existem clados específicos que são significativamente mais diversos que o esperado foi calculada a estatística *relative cladogenesis* ( $rc$ ) que identifica nós nos quais o número de linhagens viventes antes desse nó e o número de descendentes a partir deste nó desviam significativamente da hipótese nula de modelo de *birth-death*

constante, ou seja, há um aumento na taxa de especiação (Purvis *et al.*, 1995). Essa estatística foi calculada no programa GEIGER 1.2-14 (Harmon *et al.*, 2008) corrigindo para testes múltiplos com o teste de Bonferroni.

## 4. Resultados

### *Análise filogenética*

Foram obtidas sequências para 110 indivíduos das espécies e morfotipos de Potamotrygonidae e grupos externos totalizando 2471 nucleotídeos, sendo 500, 736 e 1235 pares de base para os genes ATPase, COI e RAG1, respectivamente. Destes, 195, 179 e 93 foram informativos para parcimônia, respectivamente para os genes ATPase, COI e RAG1, e, dentro de Potamotrygonidae, 160, 151 e 40. Foi encontrado um indel no gene ATPase nas sequências de *Paratrygon aiereba* e *Heliotrygon rosai* nas posições 57 a 59 que foi tratado como dado ausente. Foram encontrados vários códons de parada e uma inserção de 5 pares de base na posição 462 nas sequências do gene COI de *Plesiotrygon iwamae*, provavelmente indicando cópias nucleares desse gene para essa espécie (*nuclear mitochondria DNA sequences* - NUMTs) (Zhang e Hewitt, 1996; Bensasson *et al.*, 2001). Assim, todo o gene COI foi tratado como dado ausente para a espécie *Plesiotrygon iwamae*. O melhor modelo sob o critério de AIC estimado no Treefinder foi o {TN[Optimum,Empirical]:G[Optimum]:5, J2[Optimum,Empirical]:G[Optimum]: 5, J3[Optimum,Empirical]:G[Optimum]:5}, e no MrBayes foi o GTR para com uma porção de sítios invariáveis (I) e taxa heterogênea ao longo da sequência para as três partições de genes (ATPase, COI, and RAG1).

Uma vez que ambas as análises (ML e BI) apresentaram resultados altamente congruentes da relação filogenética entre os clados principais, apenas a árvore ML é exibida, porém são mostrados os suportes gerados por ambas as análises (Fig. 1.6).

As árvores filogenéticas apontam forte suporte para a relação entre *Paratrygon aiereba* e *Heliotrygon rosai*, clado que é o grupo irmão dos demais potamotrigonídeos, em



concordância com outros relatos da literatura (Lovejoy, 1996; Lovejoy *et al.*, 1998; Nylander, 2004; Espurt *et al.*, 2010). Essa relação tem ainda o suporte do compartilhamento exclusivo de um indel. A posição de *Plestiotrygon iwamae* em relação a *Potamotrygon* não foi resolvida, possivelmente influenciada pela falta de dados do gene mitocondrial COI para essa espécie, por tratar-se possivelmente de um pseudogene. *Potamotrygon schroederi* (endêmica das bacias do Apure (alto Orinoco) e Negro, aparece como espécie-irmã de *P. yepezi* (endêmica do lago Maracaibo) com alto suporte. Essa relação foi usada como ponto de calibração para estimativa de idades absolutas de diversificação de Potamotrygonidae. *Potamotrygon* sp. 1, espécie endêmica do rio Negro, aparece como espécie-irmã do grupo roseta-ocelado (Toffoli *et al.*, 2008), embora com baixo suporte estatístico.

O grupo roseta-ocelado compreende um grupo monofilético com alto suporte, porém as relações filogenéticas entre espécies do grupo roseta-ocelado são pouco resolvidas, incluindo espécies para e polifiléticas. Dentre as espécies do grupo, *Potamotrygon falkneri*, *P. henlei*, *P. leopoldi*, *P. sp. 2* e o morfotipo *P. sp. assacu* aparecem como monofiléticas. Com exceção do morfotipo *P. sp. assacu* (que ocorre nos baixos cursos do rio Jari e Araguari), todas as espécies monofiléticas da Bacia Amazônica ocorrem exclusivamente à montante de corredeiras em tributários do rio Amazonas que drenam os escudos cristalinos da América do Sul. *P. falkneri* ocorre exclusivamente na bacia do Paraguai-Paraná (Fig. 1.1). O morfotipo *P. sp. azul* amostrado em tributário do rio Teles Pires é parafilético em respeito à espécie simpátrica *P. sp. 2* (Fig. 1.6). Indivíduos de *P. orbigny* coletados à montante de corredeiras no rio Xingu possuem haplótipos mais proximamente relacionados a espécie simpátrica *P. leopoldi* do que a outros indivíduos de *P. orbigny* coletados ao longo das planícies da bacia Amazônica.

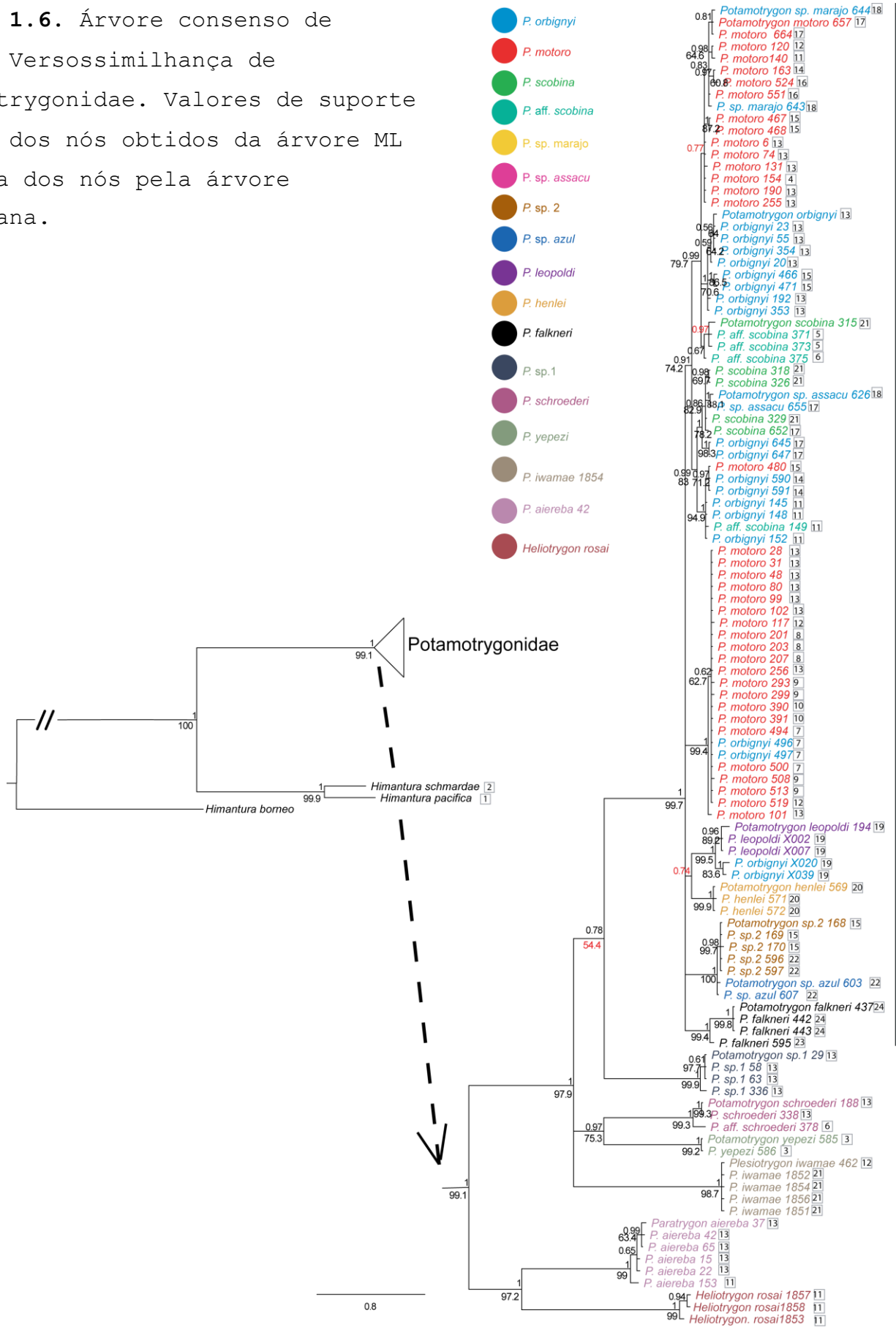
*P. motoro*, *P. orbigny*, e *P. scobina*, as três espécies do gênero *Potamotrygon* com

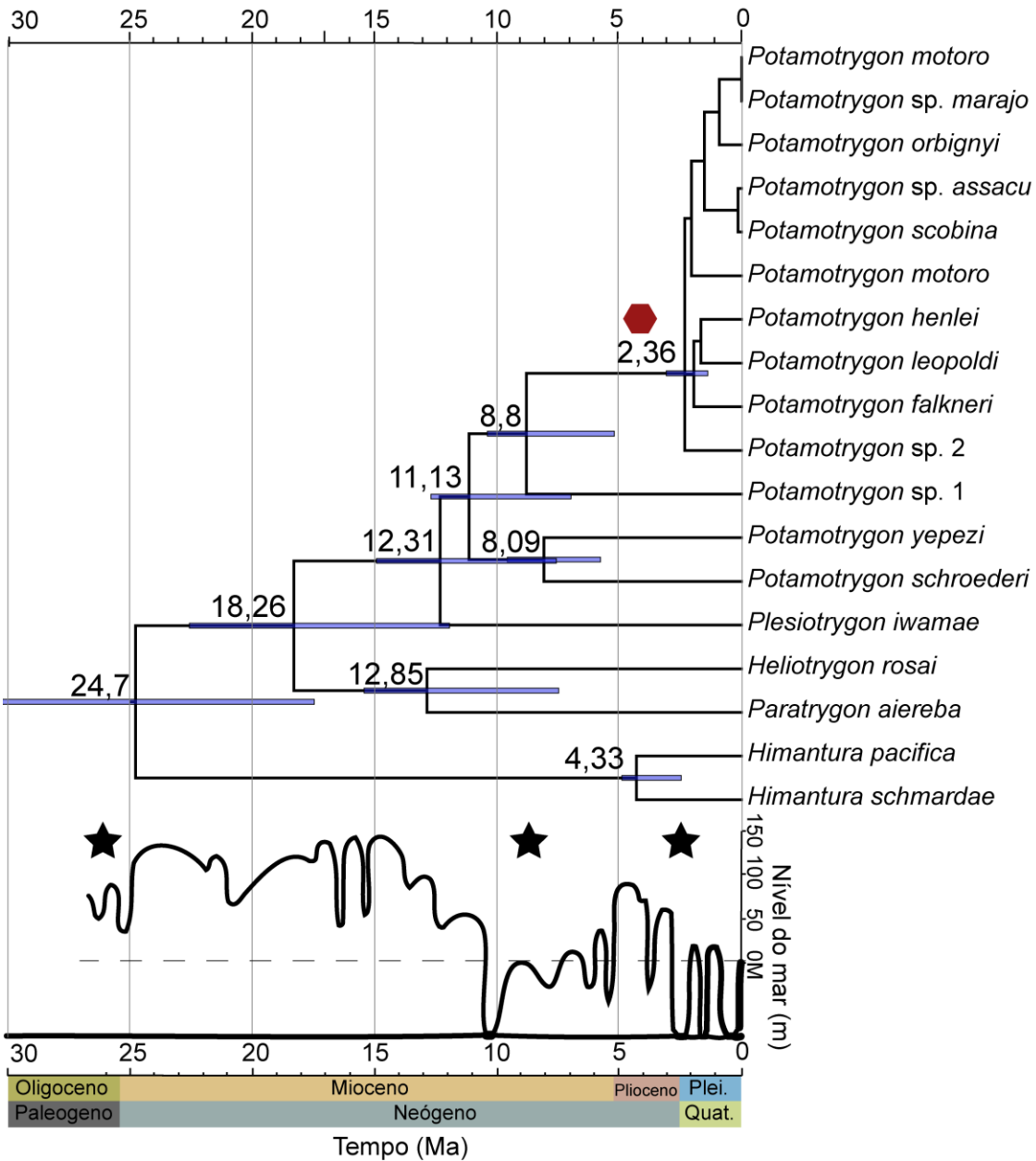
mais ampla distribuição na Bacia Amazônica, mais o morfotipo *P. sp. marajo*, compartilham haplótipos extensivamente. O complexo de espécies *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* também é parafilético em respeito ao morfotipo monofilético *P. sp. assacu*.

### ***Estimativa de idades de divergência***

A idade de divergência entre os clados Potamotrygonidae e *Himantura pacifica* + *H. schmardae* foi datada em 24,7 Ma, concordante com idade do Mioceno Inferior estimado por Lovejoy et al. (1998, Fig. 1.7). A separação entre *Paratrygon aiereba* e *Heliotrygon rosai* é de 11,9 Ma. A diversificação dentro de *Potamotrygon* segue algo como um gradiente de idades ao longo do eixo Noroeste ao Sul-Sudeste da América do Sul, com a cladogênese mais antiga entre *Potamotrygon yepezi* (Maracaibo) e *P. schroederi* (Apure/Negro), seguida da cladogênese entre *P. sp. 1* (Negro) e o ancestral do grupo roseta-ocelado. Por fim, a diversificação dentro do grupo politômico roseta-ocelado ocorreu há ~ 2,4 Ma. Esse grupo é amplamente distribuído na América do Sul, incluindo espécies que ocorrem na bacia Amazônica nas planícies bem como espécies endêmicas à montante de corredeiras nos escudo Brasileiro e na bacia do Paraná-Paraguai.

**Figura 1.6.** Árvore consenso de Máxima Versossimilhança de Potamotrygonidae. Valores de suporte abaixo dos nós obtidos da árvore ML e acima dos nós pela árvore Baiesiana.





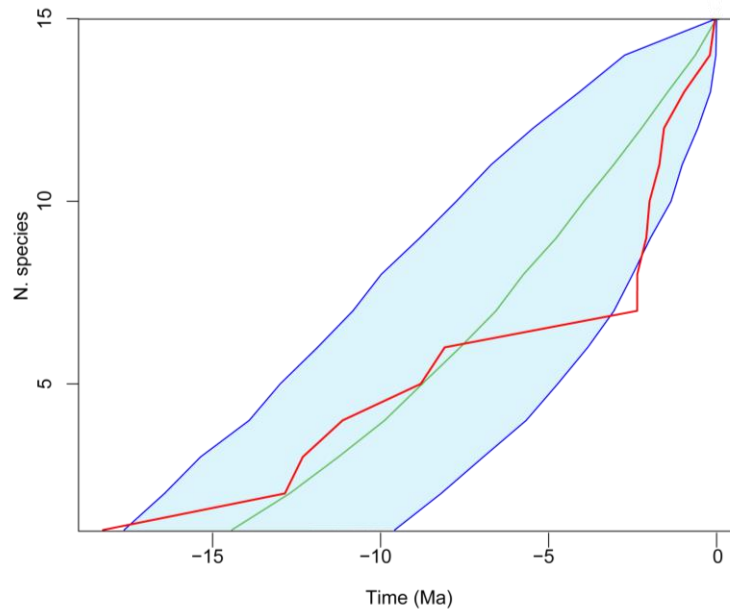
**Figura 1.7.** Cronograma da árvore Potamotrygonidae. O polígono representa mudança (aumento) na taxa de diversificação, estimada pela estatística *rate cladogenesis* (rc). Abaixo indicado nível do mar (linha) e três episódios de maior encurtamento dos Andes (ver figura 1.2).

### ***Padrões de diversificação***

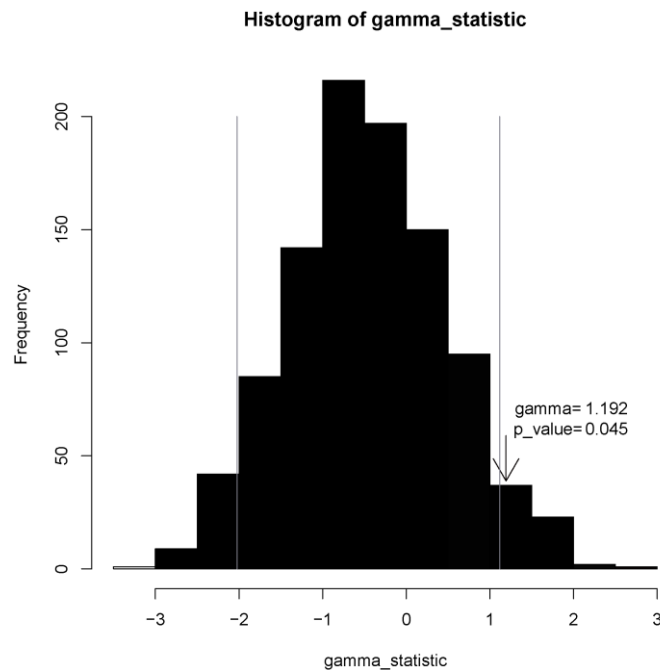
A topologia de Potamotrygonidae é significativamente mais desbalanceada que árvores simuladas sob o modelo de Yule para os dois índices,  $p=0,012$  e  $0,02$  para os índices de Colless e Sackin, respectivamente.

O plot LTT da filogenia empírica de Potamotrygonidae apresenta concavidade, ficando abaixo do intervalo de 95% das árvores simuladas em idade aproximada de 2,5 Ma (Fig. 1.8). Uma subida íngreme na curva bem perto do presente sugere um aumento na taxa de especiação; entretanto, uma taxa constante de diversificação com alta taxa de extinção também gera o mesmo padrão (Nee *et al.*, 1994; Rosa *et al.*, 2008). A estatística  $\gamma$  empírica foi significativamente maior que os valores calculados para as árvores simuladas com taxa de especiação constante (1.192,  $p<0.045$ , Fig. 1.9). Isso sugere que os nós tendem a estar mais concentrados próximos ao presente. Assim, tanto o resultado do gráfico LTT, quanto a estatística  $\gamma$  sugerem um aumento na taxa de especiação próxima ao presente devido a diversificação do grupo roseta-ocelado, ou alternativamente alta taxa de extinção na família, ou ainda aumento da taxa de extinção ao longo do tempo (Rabosky, 2006).

O teste  $rc$  localizou aumento na taxa de especiação para dois clados do grupo roseta-ocelado sucessivamente inclusivos ( $p=0,021$  e  $0,019$ , respectivamente). Frequentemente é detectada significância na estatística  $rc$  em mais de um clado sucessivamente aninhados (problema *trickle-down*), devido à não-independência dos ramos (Nee *et al.*, 1992). Uma vez que as relações entre as espécies do grupo têm baixo suporte, considero que a diversificação ocorreu na origem do grupo roseta-ocelado (Fig. 1.7)



**Figura 1.8** *Lineages through time plot*. Em vermelho, árvore empírica; em azul, intervalo de confiança de 95% estimado a partir da simulação de 1000 árvores *pure-birth*. A árvore empírica cai abaixo do intervalo de confiança a  $\sim 2,5$  Ma (concauidade), sugerindo aumento na taxa de especiação.



**Figura 1.9.** Distribuição da estatística gamma de 1000 árvores simuladas sob o processo de *birth-death*. Linhas indicam intervalo de confiança de 95% e a seta o valor da árvore empírica de Potamostrygonidae.

## 5. Discussão

Nesse capítulo, propomos uma hipótese filogenética molecular da família Potamotrygonidae baseada em uma extensa amostragem das espécies ao longo de sua distribuição geográfica. A partir da associação entre os eventos de cladogênese e paleogeográficos, apresentamos um modelo que busca explicar a diversificação da família Potamotrygonidae após a adaptação de seu ancestral a água doce, ocorrida no início do Mioceno, desencadeada por transgressão marinha.

### ***Invasão e adaptação a água doce***

Vários organismos aquáticos derivados de água salgada são encontrados nas águas continentais da América do Sul como os botos-rosa; peixe-boi; a pescada (*Plagoscion*); as arraias de água doce; e vários invertebrados como camarões; caranguejos e moluscos (Lovejoy *et al.*, 2006 e referências lá incluídas). O ancestral desses organismos pode ter se adaptado a água doce em eventos de incursão marinha, ou por colonização a partir de estuários. No primeiro caso, as idades de colonização seriam mais ou menos sincronizadas entre diferentes táxons, enquanto que no segundo, as idades poderiam ser mais ou menos independentes entre os táxons.

No caso de adaptação a água doce após transgressão marinha, espera-se um padrão filogenético nos casos em que o grupo marinho irmão ao de água doce apresente distribuição geográfica contígua ao local hipotetizado da transgressão marinha; que a idade estimada de cladogênese entre esses grupos seja compatível com a idade estimada do potencial evento de transgressão marinha; e que os eventos de cladogênese dentro do grupo

de água doce apresentem idades mais antigas para espécies mais próximas geograficamente ao local de origem da transgressão marinha. Esses padrões partem do pressuposto de que as distribuições presentes das espécies não diferem dramaticamente das suas distribuições originais, o que do contrário obscureceria o contexto geográfico dos eventos de especiação (Brooks e McLennan, 1991).

Lovejoy (1996; 1998) encontrou que o clado composto pelas espécies *Himantura schmardae* e *H. pacifica* é irmão do clado Potamotrygonidae; que sua distribuição geográfica anfi-americana e que a idade de separação de Potamotrygonidae estimada para o início do Mioceno é compatível com o cenário de adaptação do ancestral marinho a água doce após a transgressão marinha ocorrida quando da formação do Sistema Pebas no Noroeste da América do Sul. Ainda, ele determinou que a família Potamotrygonidae é monofilética e, portanto, derivada de um único ancestral comum mais recente, o que sugere que houve apenas um evento único de adaptação a água doce.

A idade de separação entre *Himantura* e Potamotrygonidae encontrada neste estudo foi estimada em ~24,7 Ma, compatível com a idade estimada por Lovejoy (1998) para o início do Mioceno. Além disso, as idades de cladogênese dentro do gênero *Potamotrygon* parecem seguir um gradiente, no qual as idades mais antigas se concentram no Noroeste da América do Sul (ver discussão abaixo). Também foi confirmado o monofiletismo da família.

Assim, o presente estudo corrobora a conclusão de Lovejoy (1998) de que a família Potamotrygonidae originou-se a partir da adaptação de um único ancestral comum a água doce após transgressões marinhas ocorrida no noroeste da América do Sul no início do Mioceno. Cooke *et al.* (2011) sugerem que o gênero *Plagioscion* tenha se adaptado durante o mesmo evento, reforçando a importância das transgressões para geração de diversidade de organismos aquáticos derivados de água salgada na América do Sul. O fato de ambas as



estimativas de adaptação do ancestral marinho (*Potamotrygonidae* e *Plagioscion*) apontarem para o início do Mioceno pode indicar que embora possa ter havido várias incursões marinhas entre ~25 e 10 Ma (Hovikoski *et al.*, 2010; Fig. 1.2) possivelmente as incursões do início do Mioceno tenham sido mais extensas e aí teriam ocorrido as adaptações a água doce. Essa maior extensão pode ter sido ocasionada por subsidência da bacia foreland devido ao soerguimento dos Andes no fim do Oligoceno-início do Mioceno (Fig. 1.2).

### ***Filogenia de Potamotrygonidae e idades de cladogênese***

O gênero recém-descrito *Heliotrygon* é filogeneticamente mais relacionado a *Paratrygon*, em conformidade com o proposto por Carvalho & Lovejoy (2011) e é separado desta por cerca de 12,8 Ma (7,5-15,4). *Heliotrygon* ocorre exclusivamente na calha principal do rio Amazonas e em tributários do Alto Amazonas a Oeste, com água rica em sedimentos em suspensão derivado dos Andes. Essa idade de cladogênese concorda, grosso modo, com a idade estimada para o estabelecimento do rio Amazonas transcontinental proposta por Figueiredo *et al.* (2009), Dobson *et al.* (2008) e Harris e Mix (2002); (11,8, 9 e 8 Ma, respectivamente) e o fato de que *Heliotrygon* está restrito à calha principal do rio Amazonas poderia ser um indicativo da origem do rio Amazonas transcontinental.

*Plesiotrygon iwamae* é mais proximamente relacionada às espécies do gênero *Potamotrygon* do que a de *Paratrygon*, em concordância com outros estudos (Lovejoy, 1996; Carvalho, M. R. *et al.*, 2004; Toffoli *et al.*, 2008), porém não foi possível resolver se *Potamotrygon* é parafilético em relação a *Plesiotrygon*, possivelmente influenciado por dados ausentes oriundos dos NUMTs das sequências de COI. Mais dados devem ser analisados para conclusão sobre posicionamento de *Plesiotrygon*. A idade do ancestral comum entre *P.*

*iwamae* e *Potamotrygon* foi estimada em ~ 12,3 (14,9 -7,6 Ma), de forma que essa seria idade máxima do surgimento de *P. iwamae*. Essa espécie, a exemplo de *Heliotrygon*, ocorre exclusivamente na calha principal do rio Amazonas e em tributários com água rica em sedimentos em suspensão derivado os dos Andes, apresentando inclusive uma longa cauda adaptada a águas de forte correnteza, única dentre os potamotrygonídeos. A data de origem também concorda com a idade estimada para o estabelecimento do rio Amazonas transcontinental, o que pode ser considerado uma segunda evidência independente do estabelecimento do rio Amazonas transcontinental.

O padrão e idade de diversificação do gênero *Potamotrygon*, grupo da grande maioria das espécies da família, sugere outro cenário para o estabelecimento da bacia Amazônica moderna. O ancestral comum mais recente do gênero viveu há pelo menos ~ 11,1 Ma. Entretanto, a espécie *Potamotrygon magdalenae* (não analisada nesse estudo) é endêmica da bacia do rio Magdalena, o que necessariamente implica que a origem do ancestral do gênero pré-data o surgimento da Cordilheira Meridional e consequente isolamento da bacia do Magdalena, idade estimada em ~11,8 Ma (Hoorn *et al.*, 1995). Nessa época, no Noroeste da América do Sul, o vale do Magdalena era conectado com as planícies dos Llanos e Amazonas. Dois eventos de cladogênese então se seguiram, o primeiro ocorrendo há ~ 8,8 Ma entre as linhagens que deram origem a *Potamotrygon* sp. 1, endêmica do rio Negro, e o grupo roseta-ocelado e o segundo entre as linhagens que deram origem a *Potamotrygon yepezi*, endêmica do lago Maracaíbo na Venezuela e *Potamotrygon schroederi*, endêmica da bacia dos rios Orinoco e Negro há ~8,1 Ma. Essas duas divergências parecem estar associadas a eventos de especiação restritos às bacias do Orinoco e Negro, e assim o início da diversificação do gênero *Potamotrygon* é compatível com a hipótese de Lovejoy (1998) da invasão do ancestral da família Potamotrygonidae ter

ocorrido após transgressão marinha que ocorreu onde é hoje o lago Maracaibo entre 23 e 15 milhões de anos atrás. O monofiletismo de *Potamotrygon* sp. 1 aliado ao alto suporte de *bootstrap* evidencia se tratar de nova espécie, o que é fortemente corroborado por morfologia diagnóstica (obs. Pess.) e dieta (Shibuya *et al.*, 2009).

A grande diversidade de espécies do gênero *Potamotrygon* pertence ao grupo roseta-ocelado (Toffoli *et al.*, 2008). A origem desse grupo está associada a um aumento na taxa de especiação. Esse grupo se caracteriza por apresentar um baixo valor de *bootstrap* dando suporte às relações filogenéticas entre as espécies. Por essas características, a origem do grupo roseta-ocelado pode ser considerada um evento de radiação, *i.e.*, houve um rápido aumento no número de espécies em um curto espaço de tempo (Schluter, 2000). A radiação do grupo roseta-ocelado, cujas espécies estão amplamente distribuídas na bacia amazônica, só ocorreu há ~ 2,4 Ma (3,1-1,4 Ma).

Apesar de coletas no oeste amazônico (Fig. 1.1) não foi encontrada nenhuma espécie de *Potamotrygon* nessa localidade cuja linhagem seja mais antiga que ~ 2,4 Ma, sugerindo que esse gênero não habitava o sistema Pebas que dominou essa região por todo o Mioceno, ou alternativamente que habitou mas extinguiu-se. Também não foram encontradas espécies de *Potamotrygon* na Bacia Amazônica a leste do Arco do Purus com idades anteriores ao início da radiação, sugerindo assim que o ancestral desse grupo estava restrito ao sistema Orinoco-rio Negro.

A distribuição geográfica restrita do gênero *Potamotrygon* às bacias do Orinoco e Negro antes do início da diversificação do grupo roseta-ocelado há ~2,4 é corroborado pela idade da espécie *P. falkneri*. Essa espécie pertence ao grupo roseta-ocelado e é endêmica ao sistema Paraguai-Paraná. Como consequência das arraias terem colonizado a América do Sul a partir do Noroeste da América do Sul, o sistema Paraná-Paraguai deve ter sido

colonizado a partir da Bacia Amazônica. É reportado troca de ictiofauna entre esses dois sistemas há ~ 10 Ma (Lundberg *et al.*, 1998; Montoya-Burgos, 2003) e também há ~ 2 Ma (Hubert *et al.*, 2007). Assim a idade de origem de *P. falkneri* há ~2,4 Ma serve como evidência da ausência de arraias do gênero *Potamotrygon* no Oeste amazônico no lago Pebas há ~ 10 Ma, caso contrario esperar-se-ia que houvesse espécies de arraias com essa idade aproximada na bacia Paraguai-Paraná. Essa idade sugere que as arraias colonizaram a bacia do Paraguai-Paraná um pouco antes de ~ 2,4 Ma.

Arraias da família Potamotrygonidae não ocorrem nas bacias do rio São Francisco e rios costeiros do Atlântico e não ocorriam historicamente à montante das cachoeiras Sete Quedas no Médio Paraná até a construção da barragem de Itaipu, e a construção de escadas para peixes. A vicariância entre peixes do gênero *Hipostomus* do (rios Paraguai+baixo Paraná+Uruguai) do alto rio Paraná e rios costeiros ocorreu há pelo menos 4,2 Ma (clado D2 Paraná+East Coastal de Montoya-Burgos, 2003). A separação entre peixes do São Francisco e alto Paraná ocorreu há ~ 6 Ma (seu clado D4) (clado D4 de Montoya-Burgos, 2003). A ausência de arraias nessas bacias sugere que as arraias não haviam colonizado o sistema Paraguai + baixo Paraná + Uruguai antes de ~4,2 Ma, porque caso tivessem colonizado nessa época, provavelmente hoje também estariam distribuídas no alto Paraná e, se tivessem colonizado antes de ~6 Ma, também estariam na bacia do Rio São Francisco.

A ausência de arraias nessas bacias, somado ao fato da idade de ~2,4 Ma de *P. falkneri*, sugere uma colonização recente dessas bacias a partir da bacia Amazônica. Hubert *et al.* (2007) sugerem conexão entre essas bacias há ~2,1 Ma a partir de estudo com piranhas do gênero *Serrasalmus*. Foi documentado soerguimento dos Andes na região andina adjacente à bacia do Madeira/Pantanal há ~ 2,1 Ma (Echavarría *et al.*, 2003; Oncken

*et al.*, 2006; Uba *et al.*, 2006; Fig. 1.2) Assim, sugiro que houve subsidência flexural da bacia antepaís (*foreland*) devido à carga orogênica dos Andes, conectando as duas bacias há ~ 2,1 Ma. Essa conexão teria permitido troca de ictiofauna como arraias e piranhas.

As espécies/morfotipos do grupo roseta-ocelado *Potamotrygon leopoldi*, *P. henlei*, *P. sp. 2* e *P. sp azul* são endêmicas de tributários do Baixo Amazonas (a leste do Arco do Purus), ocorrendo exclusivamente à montante de corredeiras e cachoeiras dos rios Xingu, Tocantins e Tapajós (*P. sp. 2* e *P. sp azul*) respectivamente. O fato de existirem espécies endêmicas à montante de cachoeiras/corredeira indica que essas falhas geológicas servem de barreira física para a dispersão das arraias da família Potamotrygonidae, que são espécies bênticas. Como as arraias colonizaram os ambientes de água doce a partir do Noroeste da América do Sul (Lovejoy *et al.*, 1998; presente estudo), os trechos a montante dos tributários do baixo Amazonas devem ter sido colonizados no sentido do rio Amazonas para os tributários. Durante o Plioceno, entre ~ 5 e 3 Ma, o nível eustático do oceano estava ~ 100 m acima dos níveis atuais (Fig. 1.2). Esse aumento muito provavelmente causou represamento dos rios de água doce, que aumentaram seu nível de água, causando transbordamento (Irion *et al.*, 1995; Irion *et al.*, 1997; Irion e Kalliola, 2010). A idade estimada de ~2,4 (3,1-1,4) Ma do grupo roseta-ocelado é compatível com a hipótese de que o(s) ancestral(is) dessas espécies habitava(m) o baixo curso do rio Amazonas e com a subida das águas no Plioceno colonizou(ram) regiões acima de corredeiras. Essa colonização deve ter se dado mais ou menos sincronizadamente. Após o abaixamento das águas, eventos múltiplos de especiação ocorreram por vicariância.

Alternativamente, esse processo de colonização de regiões à montante de cachoeiras em épocas de águas altas, seguido de vicariância quando do abaixamento das águas pode ter ocorrido mais recentemente no tempo, no Pleistoceno entre ~ 2-1 Ma de anos.

Entretanto, esse cenário é menos provável, porque está no limite do intervalo de confiança da idade estimada para o nó do grupo roseta-ocelado (3,1-1,4), e, principalmente, porque os níveis do mar foram consideravelmente menores do que os encontrados no Plioceno (Fig. 1.2). Com o abaixamento do oceano, teria havido isolamento de populações e especiação por vicariância.

Essa interpretação é corroborada pelo evento de cladogênese entre *Serrasalmus geryi*, endêmica do rio Tocantins e *S. rhombeus*, da Bacia Amazônica (clado B2-3 de Hubert *et al.*, 2007), cuja idade estimada não é apontada explicitamente pelos autores, mas é necessariamente mais recente que ~5,66 Ma. Outra evidência do transbordamento dos baixos cursos dos tributários do baixo Amazonas vem de aves estudadas por Aleixo (2004), nas quais ele encontra separação de ~3 Ma que pode ter se iniciado por extensivo embaçamento do rio Tapajós. Esse cenário suporta a idéia de represamento por água doce e não invasão de águas marinhas como sugerido por (Räsänen *et al.*, 1995; Gingras *et al.*, 2002; Wesselingh, 2006; Hoorn e Wesselingh, 2010).

A baixa divergência genética, o parafiletismo e polifiletismo e compartilhamento de haplótipos entre várias espécies e morfotipos de *Potamotrygon* do grupo roseta-ocelado sugere, ou retenção de polimorfismo ancestral, ou hibridização, ou ambas. A ausência de monofiletismo recíproco ocorre somente com espécies que ocorrem nas planícies amazônicas (com exceção da parafilética *P. sp. azul* em relação a espécie simpátrica *P. sp. 2.*). O monofiletismo recíproco é atingido em função do tamanho populacional efetivo, e ocorre em média em  $4N$  gerações (Hudson, 1991). Devido à escala continental das planícies amazônicas, espera-se tamanhos populacionais grandes. Particularmente as espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* são as que apresentam mais ampla distribuição geográfica no gênero e também maior nível de polifiletismo e compartilhamento

de haplótipos. Por outro lado, grupos irmãos encontrados simpatricamente como no caso de *Potamotrygon sp. teles* e *P. sp. 2*; ou *P. leopoldi* e indivíduos de *P. orbignyi* coletados no rio Xingu sugerem hipótese de hibridização local. Estudos com mais marcadores nucleares poderão resolver a questão.

Quanto aos morfotipos, todos são para- ou polifiléticos com exceção de *Potamotrygon aff. schroederi* e *P. sp. assacu*, e assim mais dados são necessários para esclarecer se são espécies distintas, variações morfológicas intraespecíficas ou híbridos. Quanto a *P. sp. assacu*, seu *status* monofilético sugere se tratar de nova espécie distribuída no rio Araguari e Jari, embora mais coletas devem ser feitas para corroborar esse resultado. *Potamotrygon aff. schroederi* pode ser representante de *P. schroederi* coletado na bacia do Orinoco ou espécie-irmã de *P. schroederi* (ver discussão em Toffoli et al., 2008)

### ***Diversificação de Potamotrygonidae e insights da Evolução Paleogeográfica da América do Sul***

A idade da linhagem que originou Potamotrygonidae remonta há ~ 24,7 (34-17,4) Ma. Essa idade é muito próxima do início de fase de aumento no nível do mar entre 25 e 22 Ma (Haq et al., 1987, Fig. 1.2) e também da de um pulso de encurtamento dos Andes (Fig. 1.2). Assim, provavelmente o ancestral da família Potamotrygonidae adaptou-se à vida exclusiva em água doce após transgressão marinha que ocorreu onde é hoje o lago Maracaibo, anteriormente ao soerguimento da Cordilheira Meridional e Mérida (Hoorn et al., 1995; Lovejoy et al., 1998), época em que o vale do Magdalena era conectado com as planícies dos Lhanos e Amazonas. Há ~ 18,3 Ma houve a separação entre *Paratrygon* + *Heliotrygon* e *Plesiotrygon* + *Potamotrygon*, não havendo certeza se ocorreu no noroeste da América do

Sul ou a oeste, no sistema Pebas, que possivelmente estavam ligados.

As linhagens que levaram a *Heliostrygon rosai* e *Plesiostrygon iwamae* (apesar da politomia), surgiram há ~12,8 Ma (15,4 - 7,5) e ~12,3 Ma (14,9 – 7,6). Como essas espécies não ocorrem nas bacias do Orinoco, Negro e das Guianas, sugiro que essas linhagem tenham se originado no sistema Pebas, anteriormente ao soerguimento do Arco de Vaupés, uma vez que as espécies do gênero *Potamotrygon* parecia estar restritos às bacias do Orinoco e Negro, sugerindo um isolamento entre o Pebas e o sistema Orinoco-Negro.

O ancestral do gênero *Potamotrygon* deve ter surgido antes de ~11,1 Ma já que nessa idade foi estimado o soerguimento da Cordilheira meridional e consequente isolamento da bacia do Magdalena, quando surgiu *P. magdalenae*. Há ~8,1 Ma surge *P. yepezi* após soerguimento da Cordilheira de Mérida e isolamento do lago Maracaibo. A origem do gênero *Potamotrygon* parece estar restrito ao Orinoco/Negro de forma que sugiro que há ~ 12 Ma o Arco de Vaupés se soergueu (Lundberg *et al.*, 1998; Mora *et al.*, 2010) isolando o Pebas do Orinoco/Negro, ou alternativamente, espécie(s) de *Potamotrygon* colonizaram o sistema Pebas mas foram extintas com incursões marinhas. Esse cenário é mais improvável, uma vez que a linhagem que originou a espécie estritamente associada a rios com origens andinas é mais antigo que a diversificação do gênero.

Uma possível causa para a separação entre as bacias Orinoco/Negro do Oeste amazônico (Pebas) seria o soerguimento do Arco de Vaupés há pelo menos 8 Ma (Lundberg, 1998) ou possivelmente antes (Mora *et al.*, 2010) isolando a norte a bacia do Orinoco do sistema Pebas; e o Arco de Carauari (Fig. 1.4), isolando a oeste o sistema Pebas e a leste o sistema Orinoco/Negro. Apesar de poucas evidências demonstrando que esse antigo arco estava soerguido durante o Mioceno, estudos de megaleques apontam para uma evidência indireta de sua presença (Wilkinson *et al.*, 2010).



A conexão entre o Orinoco e Negro é de certa forma pouco clara. *P. motoro* e *P. aff. scobina* do Orinoco compartilham haplótipos com indivíduos do Amazonas. Esse padrão sugere conexão muito recente ou presente (pelo Cassiquiare) entre bacias do Orinoco e Negro. Assim, uma conexão entre as bacias pode nunca ter cessado.

O isolamento do Orinoco/Negro da bacia Amazônica teria permanecido até ~ 2,4 Ma, início da radiação do grupo roseta-ocelado. Essa constatação advém da ausência de espécies do gênero *Potamotrygon* com idades mais antigas que essa, tanto no Oeste da bacia amazônica e no sistema Paraguai-Paraná, quanto nos tributários do baixo rio Amazonas.

Esse tempo e padrão de diversificação remete a duas alternativas distintas quanto ao tempo do estabelecimento do rio Amazonas transcontinental. A primeira é de que o estabelecimento do Amazonas transcontinental tenha ocorrido entre ~12 e 7 Ma de anos, o que seria um motivo para o desencadeamento da origem das espécies *Heliotrygon spp.* e *Plesiotrygon iwamae*. Essas espécies são restritas ao canal principal do rio Amazonas e tributários de origem Andina, não ocorrendo na bacia do Negro, Orinoco e Essequibo. Nesse cenário o (alto) rio Negro teria ficado desconectado da bacia Amazônica até ~3,1 - 1,4 Ma, o que explicaria a ausência de espécies do gênero *Potamotrygon* mais antigas que ~2,4 Ma, tanto no Oeste amazônico, onde encontrava-se o lago Pebas e bacia do Paraguai-Paraná, quanto nos tributários do baixo Amazonas. Modificações geológicas teriam então estabelecido o curso atual do rio Negro, como a subsidência da área entre Negro e Branco (Bezerra, 2003) e migração da foz do rio Negro (Almeida-Filho e Miranda, 2007), possivelmente desencadeadas, ou por tectonismo dos Andes (Figs. 1.2 e 1.4) ou influência da subducção da Crista de Nazca. Com a conexão do rio Negro com o rio Amazonas, uma nova gama de ambientes se tornaram disponíveis, e as regiões a montante de corredeiras

dos rios que drenam os escudos cristalinos foram colonizados em período de aumento eustático dos oceanos e a bacia do Paraná-Paraguai foi colonizada,. O conjunto desses eventos fez com que aumentasse a taxa de especiação, dando origem à radiação do grupo roseta-ocelado. Difícil conciliar nesse cenário como o alto rio Negro teria se mantido isolado do sistema Pebas pois teria havido a transposição do Arco do Purus e do hipotetizado Arco de Carauari, que seriam as barreiras que isolavam o Pebas do Negro/Orinoco.

Alternativamente, o rio Amazonas transcontinental poderia ter se desenvolvido bem mais recentemente, há ~3 Ma. Grandes mudanças geológicas ocorreram nesse tempo, como o soerguimento dos Andes, a subducção da Crista de Nazca e mudanças nos cursos de rios devido a eventos tectônicos (Costa *et al.*, 2001; Bezerra, 2003). O estabelecimento do Amazonas transcontinental teria conectado o rio Negro ao restante da bacia Amazônica desencadeando a radiação do grupo roseta-ocelado. Esse cenário acomoda melhor a hipótese de isolamento do Alto rio Negro, pois o Arco do Purus poderia ter isolado o Alto Negro do Baixo rio Negro + Bacia Amazônica leste; enquanto que o Arco de Carauari teria o isolado do sistema Pebas. Entretanto esse cenário não explica as origens de *Heliotrygon* spp. e *Plesiotrygon iwamae*. O ancestral dessas espécies pode ter colonizado o sistema Pebas antes do soerguimento do Arco de Vaupés e ter vivido no sistema Pebas, que ficou como sistema arreico até o estabelecimento do Amazonas transcontinental.

Em qualquer dos dois cenários, a ampliação continental de ambientes disponíveis para um grupo taxonômico singular como arraias provavelmente as colocou em contato com nichos ecológicos vagos, conforme predito pela teoria da Oportunidade Ecológica (Schluter, 2000). Essa condição possivelmente desencadeou a diversificação do grupo por especiação ecológica, além de especiação por vicariância nos casos das espécies à montante das corredeiras, e separação entre bacias hidrográficas (Amazonas e Paraguai-Paraná).

## 6. Bibliografia

- Aleixo A (2004) Historical diversification of a "terra-firme" forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution* **58**, 1303-1317.
- Almeida-Filho R, Miranda FP (2007) Mega capture of the Rio Negro and formation of the Anavilhanas Archipelago, Central Amazônia, Brazil: Evidences in an SRTM digital elevation model. *Remote Sensing of Environment* **110**, 387–392.
- Assumpção M (1992) The Regional Intraplate Stress Field in South America. *Journal of Geophysical Research* **97**, 11889-11903.
- Audemard FA (2003) Geomorphic and geologic evidence of ongoing uplift and deformation in the Merida Andes, Venezuela. *Quaternary International* **101-102**, 43-65.
- Barraclough TG, Nee S (2001) Phylogenetics and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 391-399.
- Bensasson D, Zhang D-X, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 314-321.
- Bezerra PEL (2003) *Compartimentação Morfotectônica do Interflúvio Solimões-Negro*, Universidade Federal do Pará.
- Brooks DR, McLennan DA (1991) *Phylogeny, Ecology and Behavior: a research in Comparative Biology* University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Campbell Jr. KE (2010) Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin: COMMENT. *Geology Forum*, e212.
- Campbell Jr. KE, Frailey CD, Romero Pittman L (2006) The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **239**, 166-219.
- Campbell Jr. KE, Heizler M, Frailey CD, Romero-Pittman L, Prothero DR (2001) Upper Cenozoic chronostratigraphy of the southwestern Amazon Basin. *Geology* **29**, 595–598.
- Caputo MV (1991) Solimões megashear: Intraplate tectonics in northwestern Brazil. *Geology*

19, 246-249.

- Carvalho MR, Lovejoy NR, Rosa RS (2003) Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (eds. Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ), pp. 22-28. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- Carvalho MR, Maisey JG, Grande L (2004a) Freshwater stingrays of the Green River formation of Wyoming (early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **284**, 1-136.
- Carvalho MRd, Lovejoy NR (2011) Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa* **2776**, 13-48.
- Carvalho MRd, Maisey JG, Grande L (2004b) Freshwater stingrays of the Green River formation of Wyoming (early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **284**, 1-136.
- Carvalho MRd, Perez MHS, Lovejoy NR (2011) *Potamotrygon tigrina*, a new species of freshwater stingray from the upper Amazon basin, closely related to *Potamotrygon schroederi* Fernandez-Yépez, 1958 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa* **2827**, 1-30.
- Carvalho MRd, Ragno MP (2011) An unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. nov., from the upper and mid amazon basin: the second species of *Plesiotrygon* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo* **51**, 101-138.
- Carvalho MRd, Silva JPCBd (2011) A taxonomic and morphological redescription of *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963 (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology* **9**, 209-232.
- Chan KMA, Moore BR (2002) Whole-Tree Methods for Detecting Differential Diversification Rates. *Systematic Biology* **51**, 855-865.
- Colless DH (1982) Review of Phylogenetics: The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics. *Systematic Zoology* **31**, 100-104.
- Cooke GM, Chao NL, Beheregaray LB (2011) Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia:

- the biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). *Journal of Biogeography* **39**, 724-738.
- Costa JBS, Léa Bemerguy R, Hasui Y, da Silva Borges M (2001) Tectonics and paleogeography along the Amazon river. *Journal of South American Earth Sciences* **14**, 335-347.
- DeCelles PG, Giles KA (1996) Foreland basin systems. *Basin Research* **8**, 105-123.
- Deynat P (2006) *Potamotrygon marinae* n. sp., une nouvelle espece de raies d'eau douce de Guyane (Myliobatiformes, Potamotrygonidae). *Comptes Rendus Biologies* **329**, 483-493.
- Dobson DM, Dickens GR, Rea DK (2001) Terrigenous sediment on Ceara Rise: a Cenozoic record of South American orogeny and erosion. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **165**, 215–229.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLoS Biology* **4**, 699-710.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 1-8.
- Duncan WP, Costa OTF, Araújo MLG, Fernandes MN (2009) Ionic regulation and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in gills and kidney of the freshwater stingray *Paratrygon aiereba* living in white and blackwaters in the Amazon Basin. *Journal of Fish Biology* **74**, 956-960.
- Dunn KA, McEachran JD, Honeycutt RL (2003) Molecular phylogenetics of myliobatiform fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with comments on the effects of missing data on parsimony and likelihood. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**, 259-270.
- Echavarría L, Hernández R, Allmendinger R, Reynolds J (2003) Subandean thrust and fold belt of northwestern Argentina: Geometry and timing of the Andean evolution. *American Association of Petroleum Geologists Bulletin* **87**, 965-985.
- Espurt N, Baby P, Brusset S, *et al.* (2010) The Nazca Ridge and uplift of the Fitzcarrald Arch: implications for regional geology in northern South America. In: *Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past* (eds. Hoorn C, Wesselingh FP). Wiley-Blackwell.
- Espurt N, Baby P, Brusset S, *et al.* (2007) How does the Nazca Ridge subduction influence the modern Amazonian foreland basin? *Geology* **35**, 515-518.

- Figueiredo J, Hoorn C, Ven Pvd, Soares E (2009) Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology* **37**, 619-622.
- Franzinelli E, Igreja H (2002) Modern sedimentation in the Lower Negro River, Amazonas State, Brazil. *Geomorphology* **44**, 259-271.
- Gadagkar SR, Rosenberg MS, Kumar S (2005) Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **304**, 64-74.
- Gingras MK, Räsänen ME, Ranzi A (2002) The significance of bioturbated inclined heterolithic stratification in the southern part of the miocene Solimoes formation, Rio Acre, Amazonia Brazil. *Palaios* **17**, 591-601.
- Hamilton A (2001) Phylogeny of *Limia* (Teleostei: Poeciliidae) based on NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**, 277-289.
- Haq BU (1984) Paleooceanography: a synoptic overview of 200 million years of ocean history. In: *Marine geography and oceanography of Arabian Sea and coastal Pakistan* (eds. Haq BU, Milliman JD), pp. 201-234. Van Nostrand Reinhold, New York, NY.
- Haq BU, Hardenbol J, Vail PR (1987) Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science* **235**, 1156-1166.
- Harmon LJ, Weir JT, Brock CD, Glor RE, Challenger W (2008) GEIGER: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics* **24**, 129-131.
- Harris SE, Mix AC (2002) Climate and tectonic influences on continental erosion of tropical South America, 0–13 Ma. *Geology* **30**, 447–450.
- Hoorn C (1994) An environment reconstruction of the paleo-Amazon River system (middle-late Miocene, NW Amazonia). *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology* **112**, 187-238.
- Hoorn C, Guerrero J, Sarmiento GA, Lorente MA (1995) Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology* **23**, 237-240.
- Hoorn C, Vonhof HB (2006) Neogene Amazonia: Introduction to the special issue. *Journal of South American Earth Sciences* **21**, 1-4.
- Hoorn C, Wesselingh FP (2010) *Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past* Wiley-Blackwell.

- Hoorn C, Wesselingh FP, Hovikoski J, Guerrero J (2010) The development of the Amazonian mega-wetland (Miocene; Brazil, Colombia, Peru, Bolivia). In: *Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past* (eds. Hoorn C, Wesselingh FP), pp. 124-142. Wiley-Blackwell.
- Horton BK, DeCelles PG (1997) The modern foreland basin system adjacent to the Central Andes. *Geology* **25**, 895-898.
- Hovikoski J, Gingras M, Räsänen M, *et al.* (2007) The nature of Miocene Amazonian epicontinental embayment: High-frequency shifts of the low-gradient coastline. *Geological Society of America Bulletin* **119**, 1506-1520.
- Hovikoski J, Räsänen ME, Gingras M, *et al.* (2005) Miocene semidiurnal tidal rhythmites in Madre de Dios, Peru. *Geology* **33**, 177-180.
- Hovikoski J, Wesselingh FP, Räsänen M, Gingras M, Vonhof HB (2010) Marine influence in Amazonia: evidence from the geological record. In: *Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past* (eds. Hoorn C, Wesselingh FP), pp. 143-161. Wiley-Blackwell.
- Hubert N, Duponchelle F, Nuñez J, *et al.* (2007) Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* **16**, 2115-2136.
- Hubert N, Renno J-F (2006) Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography* **33**, 1414-1436.
- Hudson RR (1991) Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* **7**, 1-44.
- Irion G, Junk WJ, de Melo JASN (1997) The large central Amazonian river floodplains: geological, climatological, hydrological and geomorphological aspects. In: *The central Amazon floodplain. Ecology of a pulsing system* (ed. Junk WJ), pp. 23-46. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Irion G, Kalliola RJ (2010) Long-term landscape development processes in Amazonia. In: *Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past* (eds. Hoorn C, Wesselingh FP), pp. 185-197. Wiley-Blackwell.
- Irion G, Muller J, Mello JN, Junk WJ (1995) Quaternary geology of the Amazonian Lowland. *Geo-Marine Letters* **15**, 172-178.
- Irion G, Räsänen M (2005) D. Rossetti, P. Mann de Toledo, A.-M. Góes, New geological

- framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research* **64**, 279-282.
- Jobb G, Haeseler Av, Strimmer K (2004) TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* **4**, 1-9.
- Kaandorp RJG, Wesselingh FP, Vonhof HB (2006) Ecological implications from geochemical records of Miocene Western Amazonian bivalves. *Journal of South American Earth Sciences* **21**, 54-74.
- Knowlton N, Weigt LA, Solorzano LA, Mills DK, Bermingham E (1993) Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science* **260**, 1629-1632.
- Kozak KH, Weisrock DW, Larson A (2006) Rapid lineage accumulation in a non-adaptive radiation: phylogenetic analysis of diversification rates in eastern North American woodland salamanders (Plethodontidae: Plethodon). *Proceedings of the Royal Society B* **273**, 539-546.
- Landau B, Silva CMd, Vermeij G (2009) Pacific elements in the Caribbean Neogene gastropod fauna: the source-sink model, larval development, disappearance, and faunal units. *Bulletin de la Societe Geologique de France* **180**, 343-352.
- Latrubesse EM, Silva SAFd, Cozzuol M, Absy ML (2007) Late Miocene continental sedimentation in southwestern Amazonia and its regional significance: Biotic and geological evidence. *Journal of South American Earth Sciences* **23**, 61-80.
- Lima CCd (2000) Ongoing compression across intraplate South America: observations and some implications for petroleum exploitation and exploration. *Revista Brasileira de Geociências* **30**, 203-207.
- Lis JT, Schleif R (1975) Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic acids research* **2**, 383-390.
- Lovejoy NR (1996) Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society* **117**, 207-257.
- Lovejoy NR, Albert JS, Crampton WGR (2006) Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences* **21**, 5-13.



- Lovejoy NR, Bermingham E, Martin AP (1998) Marine incursion into South America. *Nature* **396**, 421-422.
- Lovejoy NR, de Araújo MLG (2000) Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology* **9**, 259-268.
- Lundberg JG, Marshall LG, Guerrero J, *et al.* (1998) The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (eds. Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS), pp. 13-48. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- Mapes RW (2009) *Past and present provenance of the Amazon river* PhD, University of North Carolina at Chapel Hill.
- McEachran JD, Dunn KA, Miyake T (1996) Interrelationships within the batoid fishes (Chondrichthyes: Batoidea). In: *Interrelationship of Fishes* (eds. Stiassny MLJ, Parenti LR, Johnson GD), pp. 63-84. Academic Press, New York, NY.
- Meliciano NV (2008) *Estudo filogeográfico do gênero Pterophyllum, Heckel, 1840 (Cichlidae / Heroini) na Bacia Amazônica, utilizando o gene do citocromo b e morfometria geométrica*, INPA/UFAM.
- Molnar P (2008) Closing of the Central American Seaway and the Ice Age: A critical review. *Paleoceanography* **23**, 1-15.
- Montoya-Burgos JI (2003) Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* **12**, 1855-1867.
- Mooers AO, Heard SB (1997) Inferring evolutionary process from phylogenetic tree shape. *The Quarterly Review of Biology* **72**, 31-54.
- Moore BR, Chan KMA, Donoghue MJ (2004) Detecting diversification rate variation in supertrees. In: *Phylogenetic Supertrees: Combining Information to Reveal the Tree of Life* (ed. Bininda-Emonds ORP), pp. 487-533. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands.
- Mora A, Baby P, Roddaz M, *et al.* (2010) Tectonic history of the Andes and sub-Andean zones: implications for the development of the Amazon drainage basin. In: *Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past* (eds. Hoorn C, Wesselingh FP), pp. 38-60. Wiley-Blackwell.

- Nee S, Holmes EC, May RM, Harvey PH (1994) Extinction rates can be estimated from molecular phylogenies. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* **344**, 77-82.
- Nee S, Mooers AO, Harvey PH (1992) Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 8322-8326.
- Neto DG, Jr. VH, Vilela MJA, Uieda VS (2007) Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. *Biota Neotropica* **7**, 1-4.
- Nishida K (1990) Phylogeny of the suborder Myliobatidoidei. *Memoires of the Faculty of Fisheries Hokkaido University* **37**, 1-108.
- Nores M (1999) An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *Journal of Biogeography* **26**, 475-485.
- Nores M (2004) The implications of Tertiary and Quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. *Global Ecology and Biogeography* **13**, 149-161.
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. *Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University.*
- Oncken O, Hindle D, Kley J, *et al.* (2006) Deformation of the Central Andean Upper Plate System – Facts, Fiction, and Constraints for Plateau Models. In: *The Andes: Active Subduction Orogeny* (eds. Oncken O, Chong G, Franz G, *et al.*), pp. 3-27. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: analyses of Phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* **20**, 289-290.
- Purvis A, Nee S, Harvey PH (1995) Macroevolutionary inferences from primate phylogeny. *Proceedings of the Royal Society London Ser B* **260**, 329-333.
- Pybus OG, Harvey PH (2000) Testing macro-evolutionary models using incomplete molecular phylogenies. *Proceedings of the Royal Society of London, B* **267**, 2267-2272.
- Rabosky DL (2006) LIKELIHOOD METHODS FOR DETECTING TEMPORAL SHIFTS IN DIVERSIFICATION RATES. *Evolution* **60**, 1152–1164.
- Räsänen ME, Linna AM, Santos JCR, Negri FR (1995) Late Miocene tidal deposit in the Amazonia foreland basin. *Science* **269**, 386-390.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (2003) Check List of the Freshwater Fishes of South and

Central America, p. 734. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.

- Roddaz M, Baby P, Brusset S, Hermoza W, Darrozes JM (2005a) Forebulge dynamics and environmental control in Western Amazonia: The case study of the Arch of Iquitos (Peru). *Tectonophysics* **399**, 87–108.
- Roddaz M, Brusset S, Baby P, Hérail G (2006) Miocene tidal-influenced sedimentation to continental Pliocene sedimentation in the forebulge–backbulge depozones of the Beni–Mamore foreland Basin (northern Bolivia). *Journal of South American Earth Sciences* **20**, 351-368.
- Roddaz M, Hermoza W, Mora A, *et al.* (2010) Cenozoic sedimentary evolution of the Amazonian foreland basin system. In: *Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past* (eds. Hoorn C, Wesselingh FP), pp. 61-88. Wiley-Blackwell.
- Roddaz M, Viers J, Brusset S, Baby P, Hérail G (2005b) Sediment provenances and drainage evolution of the Neogene Amazonian foreland basin. *Earth and Planetary Science Letters* **239**, 57-78.
- Rosa RS (1985) *A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)* Ph.D., The College of William and Mary.
- Rosa RS, Carvalho MRd, Wanderley CdA (2008) *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of Neotropical freshwater stingray from Surinam. *Neotropical Ichthyology* **6**, 1-8.
- Rossetti DdF (2003) Delineating shallow Neogene deformation structures in northeastern Pará State using Ground Penetrating Radar. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **75**, 235-248.
- Rossetti DdF (2004) Paleosurfaces from northeastern Amazonia as a key for reconstructing paleolandscapes and understanding weathering products. *Sedimentary Geology* **169**, 151-174.
- Rossetti DdF, Toledo PMd, Góes AM (2005) New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research*, 78-89.
- Rossetti DdF, Valeriano MM (2007) Evolution of the lowest amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. *Catena* **70**, 253–265.
- Sanderson MJ (2002) r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics* **19**, 301-302.
- Schluter D (2000) *The Ecology of Adaptive Radiation* Oxford University Press, Oxford,

England.

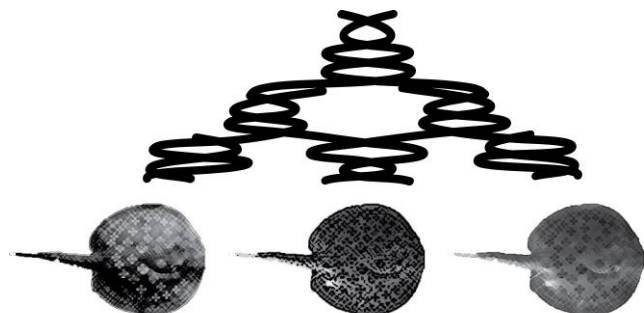
- Sempere T, Folguera A, Gerbault M (2008) New insights into Andean evolution: An introduction to contributions from the 6th ISAG symposium (Barcelona, 2005). *Tectonophysics*, 1-13.
- Shao K-T (1990) Tree balance. *Systematic Biology* **39**, 266-276.
- Shibuya A, Araújo MLG, Zuanon JAS (2009) Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii, Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* **4**, 466-475.
- Silva JPCBd, Carvalho MRd (2011) A new species of neotropical freshwater stingray of the genus *Potamotrygon* Garman, 1877 from the Río Madre de Dios, Peru (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo* **51**, 139-154.
- Sioli H (1984) The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin. In: *Monographiae Biologicae* eds. Dumont HJ, Werger MJA), p. 800. Springer Verlag, New York, NY.
- 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.
- Souza ERd (2008) *Filogeografia do gênero Neotropical Fluviophylax (CYPRINODONTIFORMES: POECILIIDAE) das Bacias do Amazonas e Orinoco*, INPA/UFAM.
- Stadler T (2012) TreeSim: Simulating trees under the birth-death mode, pp. Available at: <http://cran.r-project.org/web/packages/TreeSim/index.html>.
- Toffoli D, Hrbek T, Araújo MLG, *et al.* (2008) A test of the utility of 'barcoding' in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Genetics and Molecular Biology* **31**, 324-336.
- Uba CE, Heubeck C, Hulka C (2006) Evolution of the late Cenozoic Chaco foreland basin, Southern Bolivia. *Basin Research* **18** 145-170.
- Wesselingh FP (2006) Miocene long-lived lake Pebas as a stage of mollusc radiations, with implications for landscape evolution in western Amazonia. *Scripta Geologica* **133**, 1-17.
- Wesselingh FP, Hoorn C, Guerrero J, *et al.* (2006) The stratigraphy and regional structure of Miocene deposits in western Amazonia (Peru, Colombia and Brazil), with implications

for late Neogene landscape evolution. *Scripta Geologica* **133**, 291-322.

- Wesselingh FP, Hoorn C, Kroonenberg SB, *et al.* (2010) On the origin of Amazonian landscapes and biodiversity: a synthesis. In: *Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past* (eds. Hoorn C, Wesselingh FP), pp. 421-431. Wiley-Blackwell.
- Wesselingh FP, Räsänen ME, Irion G, *et al.* (2002) Lake Pebas: a palaeoecological reconstruction of a Miocene, long-lived lake complex in western Amazonia. *Cainozoic Research* **1**, 35-81.
- Wilkinson MJ, Marshall LG, Lundberg J, Kreslavsky MH (2010) Megafan environments in northern South America and their impact on Amazon Neogene aquatic ecosystems. In: *Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past* (eds. Hoorn C, Wesselingh FP), pp. 162-184. Wiley-Blackwell.
- Wood CM, Matsuo AYO, Gonzalez RJ, *et al.* (2002) Mechanisms of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. *The Journal of Experimental Biology* **205**, 3039-3054.
- Zhang D-X, Hewitt GM (1996) Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 247-251.
- Zoback ML, Zoback MD, Adams J, *et al.* (1989) Global patterns of tectonic stress. *Nature* **341**, 291-298.

# Capítulo 2

**Discordância mito-nuclear: múltiplos eventos de hibridação entre espécies do gênero *Potamotrygon***



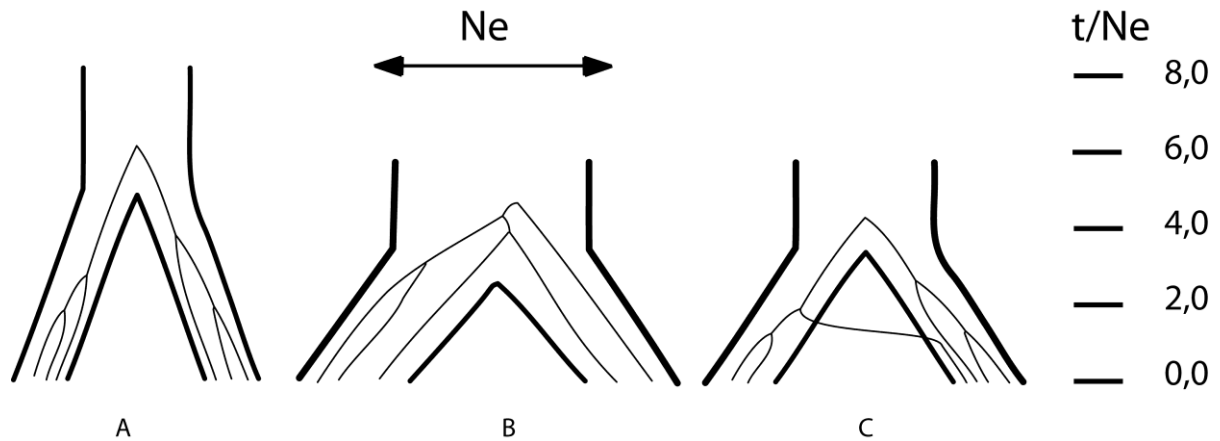
# 1. Introdução

*This tree-of-life notion of evolution attained near-iconic status in the mid-20th century with the modern neo-Darwinian synthesis in biology. But over the past 15 years, new discoveries have led many evolutionary biologists to conclude that the concept is seriously misleading and, in the case of some evolutionary developments, just plain wrong. Evolution, they say, is better seen as a tangled web.*

*Edward J. Larson e Michael L. Arnold*

Árvores de genes podem discordar das árvores de espécies devido a vários processos evolutivos, sendo que dois dos principais são a retenção de polimorfismo ancestral (ou *incomplete lineage sorting* - ILS) e a hibridação (Maddison, 1997).

ILS ocorre quando polimorfismos presentes na espécie ancestral sobrevivem em ambas as linhagens descendentes. Em genes que evoluem aproximadamente conforme a teoria da evolução neutra, a quantidade de ILS encontrada varia em função inversamente proporcional ao tamanho efetivo populacional, e do tempo transcorrido após o evento de cladogênese, medido em gerações, sendo que quanto mais longo o tempo, e menor o tamanho efetivo, menor a probabilidade de se encontrar ILS, *i.e.* maior a probabilidade de monofiletismo (Tajima, 1983; Moore, 1995; Fig. 2.1). Assim, após um evento de cladogênese, as espécies provavelmente serão polifiléticas, e com o passar do tempo, e proporcionalmente aos tamanhos efetivos populacionais, o parafiletismo se torna mais provável e por fim o monofiletismo, embora nem sempre ocorram todas as etapas (Avice, 1986; Figs. 2.1 A e B).



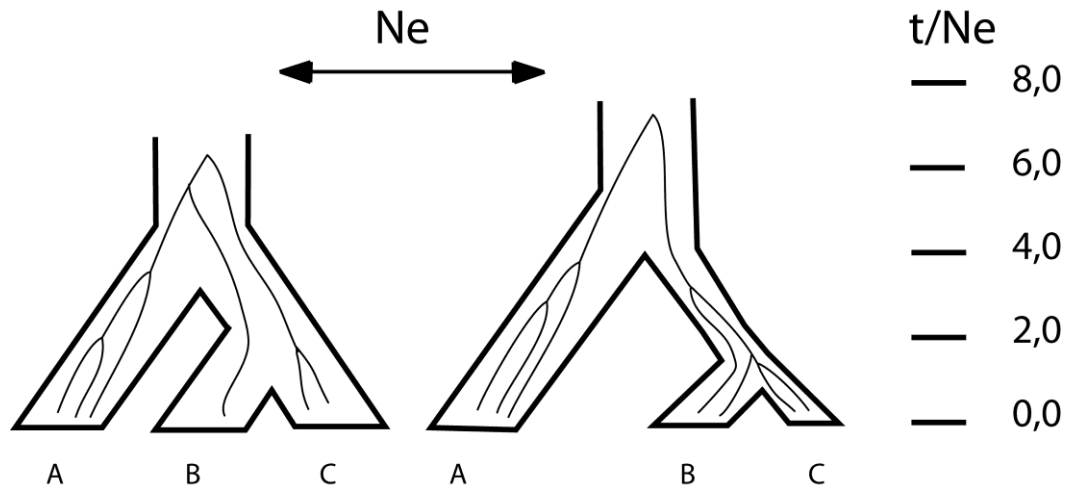
**Figura 2.1.** Árvore de gene contida na árvore de espécies. Comprimento dos ramos simboliza tempo, medido em unidades de coalescência (tempo, em anos dividido por tamanho efetivo). Largura dos ramos simboliza tamanho efetivo. A) Separação há mais tempo e tamanhos efetivos menores geraram monofiletismo; B) Separação há menos tempo e maior tamanho efetivo levaram ao polifiletismo; C) hibridação recente leva ao polifiletismo.

Radiação é o surgimento de várias espécies em um curto espaço de tempo evolutivo a partir de um ancestral comum (Schluter, 2000). Em eventos de radiação, é recorrente encontrar espécies polifiléticas, bem como falta de resolução nas relações filogenéticas, observadas em árvores de genes de *locus* único, *i.e.*, há uma incongruência entre a árvore de genes e a árvore de espécies (*e.g.* flores do gênero *Columbine* (Hodges e Arnold, 1994); grilos do Havaí (Shaw, 1996); e tentilhões de Darwin (Sato *et al.*, 1999)).

Em eventos de radiação, o comprimento dos ramos inter-nós é pequeno, de forma que fica reduzida a chance da árvore de gene rastrear a relação correta entre três ou mais espécies (Fig. 2.2). Ademais, dependendo da taxa de mutação do gene, não haverá tempo suficiente para marcar a cladogênese, o que explica a pouca resolução das relações filogenéticas comumente encontradas em árvores de grupos que experimentaram radiação e isso é amplificado em populações grandes (Moore, 1995; Degnan e Salter, 2005; Melo-Ferreira *et al.*, 2012). Boa parte dos eventos de radiação documentados ocorreram



recentemente no tempo evolutivo, de forma que, além da baixa resolução filogenética na relação entre as espécies, também é comum encontrar polifiletismo devido ao pouco tempo para ocorrer o total sorteamento dos polimorfismos ancestrais (Weisrock *et al.*, 2006) (Figs. 2.1 e 2.2).



**Figura 2.2.** Árvore de gene corresponderá a topologia da árvore de espécies, proporcionalmente ao tempo transcorrido entre sucessivos eventos de cladogênese, e inversamente proporcional ao tamanho efetivo populacional. A) Pequeno intervalo entre sucessivas cladogêneses leva a uma topologia incongruente entre a árvore de espécies e árvore de genes; B) Tempo mais longo de isolamento entre A e B, e menor tamanho efetivo de B leva a uma correta topologia (A(B,C)), embora o relativo grande tamanho populacional de B, e pouco tempo de isolamento com C, faz com que a primeira seja parafilético em relação ao segundo.

A hibridação causa a transferência de alelos entre linhagens filogeneticamente divergentes, causando reorganização genômica em pequena ou larga escala (Fig. 2.1C, Arnold *et al.*, 2012). A transmissão de alelos divergentes entre espécies gera polifiletismo na árvore filogenética (Funk e Omland, 2003). Devido ao conceito prevalente de que eventos de especiação ocorreriam fundamentalmente de forma alopátrica, eventos de hibridação

historicamente eram considerados raros, e quando ocorriam, gerariam híbridos com valor adaptativo inferior aos parentais, de forma que a hibridação seria uma força evolutiva de importância limitada (Arnold e Hodges, 1995). Entretanto, com o desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento de DNA, inúmeros exemplos de hibridação passaram a ser reportados, e modelos teóricos demonstraram ser possível que os híbridos tenham valor adaptativo menor, igual ou superior aos parentais (Arnold e Hodges, 1995; Rieseberg, 1997; Mallet, 2007; Arnold e Martin, 2010). Após uma hibridação pode haver retrocruzamento, por gerações, com os parentais, trazendo alelos transpecíficos aos seus arcabouços genômicos, fenômeno chamado de introgressão. Caso os híbridos cruzem preferencialmente entre si, podem resultar em uma nova espécie híbrida - uma especiação por hibridação (Funk e Omland, 2003). Espera-se que os efeitos da hibridação na evolução sejam rápidos, pois inúmeras combinações alélicas novas são criadas instantaneamente e os híbridos podem expressar fenótipos únicos, e não apenas um intermediário dos pais, efeito denominado segregação transgressiva (Rieseberg *et al.*, 1999). Esses novos fenótipos podem possibilitar a exploração de novos picos adaptativos (ou nichos). Novos picos adaptativos estariam particularmente disponíveis em grande quantidade quando da ocupação de novas áreas geográficas, de forma que Seehausen (2004) propôs uma teoria que a hibridação, ao aumentar a resposta à seleção, pode impulsionar eventos de radiação adaptativa. De fato, muitos exemplos documentados de radiação também estão associados à hibridação (Herder *et al.*, 2006 e referências contidas). Embora geralmente teoriza-se que a ocorrência de hibridação dependa de caráter adaptativo, Currat *et al.* (2008), por meio de modelos, demonstram que em expansões geográficas nas quais uma espécie avança sobre o território de outra há massiva introgressão assimétrica de alelos neutros da espécie local ao genoma da invasora se o valor adaptativo do híbrido não for muito baixo. Revisão da literatura

corroborar o modelo de introgressão massiva e assimétrica em eventos de expansão com hibridização (Currat *et al.*, 2008).

Distinguir entre ILS e hibridação como o fator de polifiletismo e incongruência entre árvores de genes não é trivial, pois ambos os processos podem gerar topologias idênticas (Holder *et al.*, 2001; Funk e Omland, 2003). Um meio de se diferenciar entre os dois processos é verificar a concordância topológica entre árvores de diferentes genes. É relativamente comum a discordância entre árvore nuclear e mitocondrial porque são loci não ligados e, por isso, evoluem independentemente. Assim, esse contraste pode ser usado para separar ILS de hibridação como causa de baixa resolução filogenética e polifiletismo. Na maioria dos animais, o genoma mitocondrial é haplóide e herdado maternalmente, o que lhe confere tamanho efetivo quatro vezes menor que genes nucleares e por isso árvores mitocondriais serão mais bem resolvidas, em média, do que as nucleares (Birky *et al.*, 1989; Hudson e Turelli, 2003). Entretanto, devido à grande estocasticidade da coalescência, existe a possibilidade de serem igualmente bem resolvidas, ou mesmo da nuclear ser mais resolvida (Hudson e Turelli, 2003). Mesmo que as árvores de genes sejam idênticas, quando é analisado um pequeno número de nucleotídeos de um determinado gene, a árvore filogenética reconstruída pode ser diferente da árvore de genes (Saitou e Nei, 1986). Isso acontece porque a estrutura da árvore de genes só é revelada caso haja polimorfismos entre as sequências amostradas (Hudson, 1990; Nordborg, 2001). Genes com mais alta taxa de mutação geram reconstruções filogenéticas mais próximas da árvore de genes, mantidas iguais condições como tamanho efetivo e seleção, porque mais mutações marcarão os eventos de especiação. A maioria dos genes nucleares evoluem a taxas c.a. de 10 x mais lentas que genes mitocondriais, o que faz com que, somada ao maior tamanho efetivo, árvores nucleares apresentem maior probabilidade de serem menos resolvidas, e portanto

conterem mais ILS, do que árvores mitocondriais (Pamilo e Nei, 1988).

Em contrapartida, embora ocorra introgressão tanto mitocondrial quanto nuclear, a primeira parece ser mais comum, e, portanto, genealogias mitocondriais serão menos resolvidas em táxons que passaram por esse processo evolutivo (Sota e Vogler, 2001; Shaw, 2002; Ballard e Whitlock, 2004; Chan e Levin, 2005; Linnen e Farrell, 2007). A maior quantidade de hibridação mitocondrial relatada pode ser resultado de seleção, em que o haplótipo mitocondrial vantajoso fixa-se em ambas as espécies, como por exemplo, levando à melhor adaptação térmica em ectotérmicos (Ballard e Whitlock, 2004). Como todos os genes da mitocôndria estão ligados, o genoma mitocondrial como um todo é transferido em conjunto, ao passo que o espaçamento entre os genes no núcleo possibilitam que a recombinação dilua o efeito do genoma exógeno durante a introgressão. Além da vantagem adaptativa, o modelo de Currat *et al.*(2008) prediz que os níveis de introgressão serão maiores para genes neutros com mais baixa migração intraespecífica, e portanto do DNAm e sua transmissão uniparental, porque alelos interspecíficos terão mais chance de sobreviver à deriva genética na população invasora que encontra-se na fronteira da expansão, ao sofrer menor competição de alelos oriundos da migração de populações vizinhas à fronteira.

Por fim, um dos sinais mais claros para se distinguir hibridação de ILS é o compartilhamento de haplótipos geograficamente localizados entre espécies morfológica e geneticamente divergentes (Funk e Omland, 2003), a chamada discordância biogeográfica (Toews e Brelsford, 2012). Transferência de alelos entre a fronteira de espécies deve ocorrer necessariamente localmente, e caso haja fluxo gênico restrito entre as populações, os alelos de origem transpecífica estarão espacialmente próximos ao local da hibridação (embora possam migrar boas distâncias pela onda de expansão (Excoffier *et al.*, 2009).

### **Grupo de estudo: radiação das arraias de água doce do gênero *Potamotrygon***

Nesse capítulo pretendo distinguir entre a influência da hibridização e retenção de polimorfismo ancestral (ILS) na história evolutiva de um grupo de espécies de arraias de água doce do gênero *Potamotrygon* que sofreu radiação.

O gênero *Potamotrygon* abarca 19 espécies válidas (Lis e Schleif, 1975; Carvalho *et al.*, 2003; Nylander, 2004; Gadagkar *et al.*, 2005; Deynat, 2006; Drummond e Rambaut, 2007; Duncan *et al.*, 2009), ocorrendo nos principais sistemas de rios da América do Sul que drenam até o Oceano Atlântico e Mar do Caribe, com a exceção da Bacia do rio São Francisco e drenagens costeiras a oeste e sul do rio Parnaíba (Rosa, 1985, Fig. 2.3). Entretanto a taxonomia do gênero não é bem resolvida, com ao menos duas espécie novas em descrição e algumas espécies consideradas taxonomicamente dúbias, espécies essas que apresentam grande policromatismo intraespecífico e sobreposição interespecífica de caracteres merísticos e de coloração (Carvalho *et al.*, 2003; Drummond *et al.*, 2006; Toffoli *et al.*, 2008). Grande parte da diversidade e dos problemas taxonômicos associados ao gênero *Potamotrygon* ocorre em um grupo de espécies denominado roseta-ocelado (Toffoli *et al.*, 2008). Esse grupo passou por processo de radiação que parece ter sido impulsionada por uma reorganização tectônica da Bacia Amazônica, associada a ciclos de aumento e diminuição do nível das águas que permitiram a colonização de novas áreas geográficas na transição entre o Plioceno e Pleistoceno (Capítulo 1).

Uma árvore reconstruída com o gene COI mitocondrial mostrou baixa resolução na relação entre as espécies do grupo, e polifiletismo extensivo, de tal forma que foi questionado o uso da metodologia do DNA *barcoding* para o grupo (Toffoli *et al.*, 2008). Os autores sugerem que o polifiletismo pode ser resultado de três causas, não mutuamente

excludentes: problemas taxonômicos; hibridação; ou ILS, uma vez que algumas espécies apresentam distribuições geográficas continentais nas planícies amazônicas (e.g. *P. motoro*, *P. orbigny* e *P. scobina*) e portanto podem apresentar tamanho efetivo populacional muito grande e conseqüentemente uma maior chance de ILS.

Nesse capítulo pretendo determinar o papel da hibridização e ILS durante a radiação do grupo roseta-ocelado por meio de testes de congruência entre árvores de genes mitocondriais e nuclear, incluindo tanto espécies quanto morfotipos do grupo; e ajustar modelo de isolamento com migração baseado na teoria da coalescência, de forma a quantificar hibridação entre três pares de espécies através de ampla amostragem geográfica capaz de detectar eventuais discordâncias biogeográficas.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Determinar o papel da hibridação e sorteamento incompleto de linhagens durante a radiação do grupo roseta-ocelado.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a taxa de substituição entre os genes mitocondriais ATPase e COI, e o gene nuclear RAG1.
- Estimar a filogenia dos genes mitocondriais e nuclear.
- Testar congruência entre as árvores de genes.
- Testar congruência entre as árvores de genes e a taxonomia válida.
- Verificar se há discordância biogeográfica entre os genes.
- Ajustar modelo de isolamento com migração entre três pares de espécies do grupo, analisando os *loci* em conjunto, e separados em DNAm e nuclear.

### 3. Material e métodos

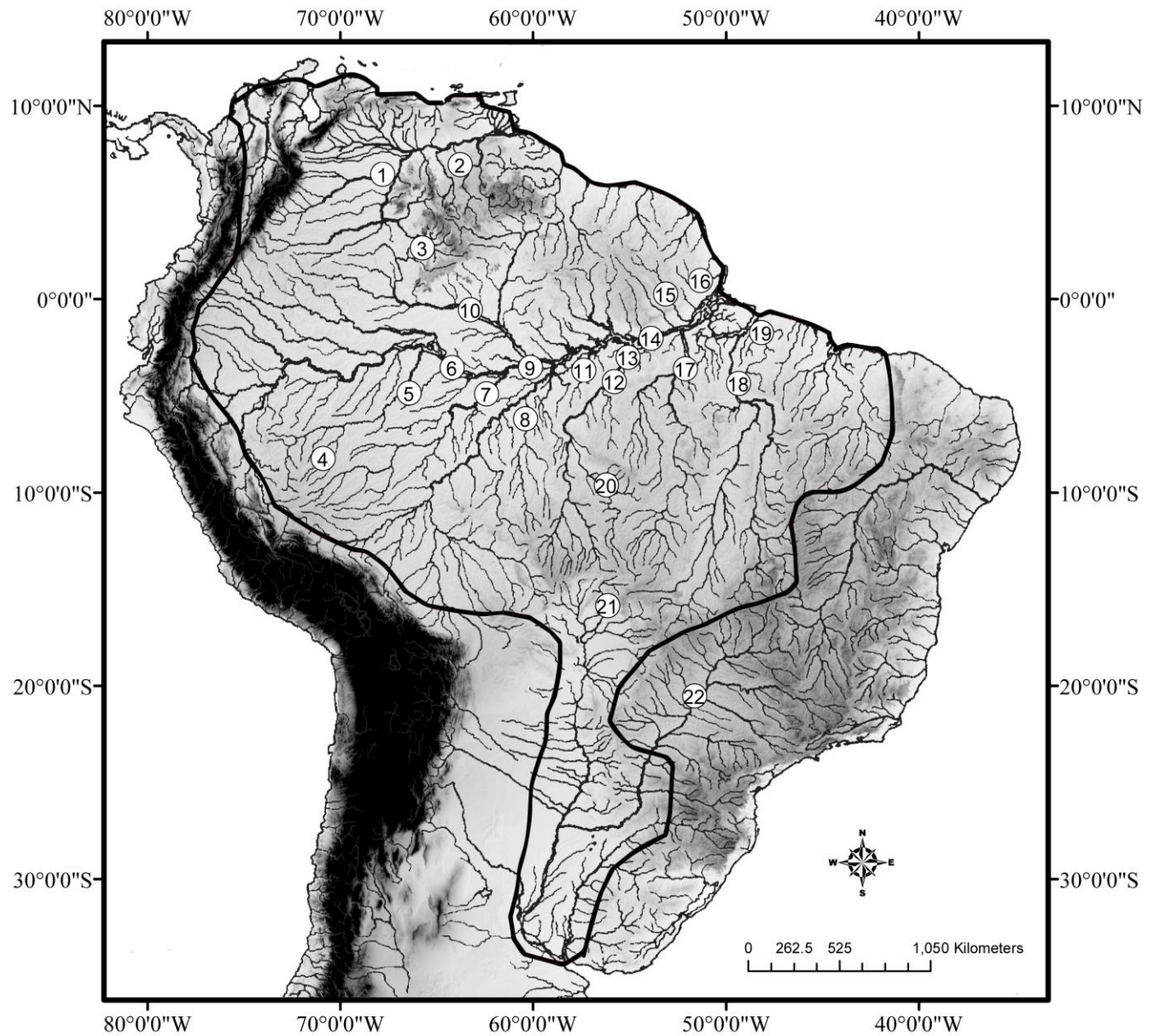
#### ***Amostragem dos táxons***

Foram amostrados 87 indivíduos do grupo roseta-ocelado pertencente ao gênero *Potamotrygon*, constituído por seis espécies (*Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, *P. scobina*, *P. falkneri*, *P. leopoldi* e *P. henlei*), uma espécie em descrição que ocorre na Bacia do rio Tapajós, à montante de corredeiras próximas a cidade de Itaituba-PA, e quatro morfotipos: *P. sp. marajo*, *P. sp. scobina*, *P. sp. assacu* e *P. sp. azul* (ver capítulo 1 para detalhes sobre os morfotipos, Fig. 2.3). As espécies *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon schroederi* foram usadas como grupos externos. Foram amostradas várias localidades para algumas espécies de forma a ser possível observar potencial discordância biogeográfica.

#### ***Análise laboratorial***

Foram sequenciadas porções de dois genes mitocondriais (citocromo oxidase, COI; e ATP desidrogenase subunidades 6 e 8, ATPase) e um gene nuclear (recombination-activating gene 1; RAG1) para todos os táxons. Extrações de DNA; reações de amplificação (incluindo *primers*) e sequenciamento foram realizadas conforme descrito no capítulo 1.





**Figura 2.3.** Rios amostrados. Distribuição geográfica da família Potamotrygonidae circunscrita por linha. 1. Parguaza, 2. Caura, 3. Mavaca, 4. Tarauaca, 5. Juruá, 6. Jarauá/médio Amazonas 1, 7. Purus, 8. Aripuanã, 9. médio Amazonas 2, 10. Negro, 11. Maués, 12. Tapajós à montante, 13. Tapajós à justante, 14. baixo Amazonas, 15. Jari, 16. Araguari, 17. Xingu, 18. Tocantins, 19. boca do Amazonas, 20. Azul, 21. Cuiabá, 22. Paraná.

### **Análise das seqüências**

O alinhamento múltiplo inicial das seqüências foi realizado no Clustal W (Thompson *et al.*, 1996) implementado no programa Bioedit 7.0.9.0 (Hall 1999) e posteriormente editado manualmente. O comprimento das seqüências alinhadas foi de 500 pb (ATPase), 736 pb (COI) e 1235 pb (RAG1). Indels foram codificados como *missing data*. O alinhamento completo foi traduzido em aminoácidos prováveis para verificação de códons de parada inesperados no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

A diferença nas taxas de evolução molecular entre os três marcadores foi comparada através da distância genética não corrigida ( $p$ ) entre seqüências, tomadas par-a-par, para cada gene em separado, calculada no programa APE (Paradis *et al.*, 2004). As distâncias  $p$  da ATPase foram plotadas contra as distâncias  $p$  dos fragmentos COI e RAG1. Em seguida, foi feito o teste *t one sample* (Sokal e Rohlf, 1995) no pacote R, para se determinar se um gene evolui a uma taxa significativamente diferente dos demais.

### **Análise filogenética e testes de congruência**

A análise filogenética considerou o critério ótimo de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*, ML) usando o programa Treefinder (Jobb *et al.*, 2004). Uma inferência filogenética bayesiana apresentou resultados similares, e por isso não é mostrada.

Foram inferidas árvores separadas para os genes mitocondriais ATPase, COI e para o gene nuclear RAG1. Uma vez que os dois genes mitocondriais não apresentaram incongruência, e por serem ligados, também foi gerada uma árvore concatenando-se os dois.

O modelo mais apropriado de substituição foi selecionado baseado no critério de informação *Akaike* (*Akaike Information Criterion* – AIC) no programa Treefinder (Jobb *et al.*, 2004). Os modelos selecionados para cada partição de genes foram ATPase (TN[Optimum,Optimum]:G[Optimum]:5), COI (J2[Optimum,Optimum] :G[Optimum]:5), ATPase + COI (GTR[Optimum,Optimum]:G[Optimum]:5), RAG1 (HKY[{3,1,1,1,1,3},Empirical]). Para encontrar a melhor árvore no critério de ML, primeiro foi gerada uma árvore com *search depth* igual a 2. Essa árvore foi usada como *center tree* para encontrar 5 outras árvores a 7 passos distantes da árvore central, de acordo com o critério *Nearest-Neighbor-Interchanges* (NNI), de forma a tentar evitar alcançar picos ótimos locais de ML. Então foi feita uma *global tree search* para encontrar a melhor árvore ML, utilizando as 5 árvores geradas por NNI como árvores iniciais. A robustez dos nós foi acessada por meio de 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*.

A congruência entre as árvores dos três genes foi avaliada por meio do teste *Incongruence Length Difference* (ILD), conforme implementado no PAUP 4.0b10 (Swofford 2002). Esse teste compara o comprimento das árvores de parcimônia das diferentes partições com partições geradas aleatoriamente por rearranjos de todo do conjunto de dados (Farris *et al.*, 1994). O objetivo é determinar estatisticamente se os caracteres que formam duas ou mais partições vem da mesma população total de caracteres, ou seja, se refletem a mesma filogenia e história evolutiva (Hipp *et al.*, 2004). O teste ILD é sensível a outros fatores, como diferentes taxas de evolução molecular entre as partições e heterogeneidade entre sítios, de forma que apresenta uma alta taxa de erro tipo I, rejeitando erroneamente congruência (Hipp *et al.*, 2004 e referências contidas). Entretanto, a baixa taxa do erro tipo II traz confiança quanto a partições congruentes, e a utilização do ILD em conjunto com outros métodos pode ser útil para detectar incongruência devido a histórias evolutivas distintas.

(Hipp *et al.*, 2004). Para o teste ILD foram realizadas 10.000 réplicas de parcimônia com adição simples de sequências e troca de ramos por *Tree Bisection-Reconnection* (TBR). O número máximo de árvores retidas foi de 10.000.

Para melhor avaliar a incongruência, foi testado qual o suporte estatístico que as diferentes partições (mitocondrial e nuclear) proviam a diferentes topologias, forçadas de acordo com o conhecimento taxonômico corrente do grupo (baseado em morfologia e padrão de coloração). Assim, foram geradas diferentes árvores ML sub-ótimas, forçando grupos monofiléticos (*constraint*), conforme as hipóteses da tabela 2.1. Quanto mais resolvida uma topologia, maior a chance de ser significativamente inferior à árvore ótima, de forma que foram testadas hipóteses sucessivamente menos restritivas, a saber: todas as espécies e morfotipos monofiléticos; todos monofiléticos com exceção dos morfotipos cuja posição taxonômica é incerta e que podem ser híbridos; como a anterior e excluindo populações de *P. orbigny* que se agruparam com *P. motoro* na árvore do RAG1, árvore essa que topologicamente foi mais aproximada com a taxonomia corrente. As árvores ML foram geradas no Garli 2.0 (Zwickl, 2006) sob o modelo GTR + G sendo que a árvore inicial foi criada por adição *step-wise*. Os demais parâmetros foram mantidos conforme as configurações originais. Os valores de verossimilhança dos sítios, calculados no Garli, foram usados para a execução do teste *Approximately Unbiased Test* (AU, Shimodaira, 2002), implementado no CONSEL (Shimodaira e Hasegawa, 2000), no qual o número de réplicas e escala foram mantidos conforme as configurações originais do programa. Para comparação, também foi feito o teste Shimodaira-Hasegawa, (SH, Shimodaira e Hasegawa, 1999), embora seja mais conservador, tanto mais quanto mais árvores alternativas forem comparadas (Degnan e Salter, 2005).

**Tabela 2.1** Hipóteses filogenéticas testadas contra árvore ML ótima não forçada por meio dos testes AU e SH.

Hipóteses	Grupos com monofiletismo forçado
<b>A</b>	<i>Potamotrygon motoro</i> , <i>P. orbignyi</i> , <i>P. scobina</i> + <i>P. aff. scobina</i> , <i>P. falkneri</i> , <i>P. sp. 2</i> , <i>P. sp. azul</i> , <i>P. leopoldi</i> , <i>P. henlei</i> , <i>P. sp. assacu</i> , <i>P. sp. marajo</i>
<b>B</b>	Mesmo que <b>A</b> , com exclusão de <i>P. sp. assacu</i> e <i>P. sp. marajo</i>
<b>C</b>	<i>Potamotrygon motoro</i> , <i>P. orbignyi</i> , <i>P. scobina</i> + <i>P. aff. scobina</i> e exclusão de <i>P. sp. assacu</i> , <i>P. sp. Marajo</i>
<b>D</b>	Mesmo que <b>B</b> mas sem populações de <i>P. orbignyi</i> do Tarauacá, Maués e Aripuanã
<b>E</b>	Mesmo que <b>C</b> mas sem populações de <i>P. orbignyi</i> do Tarauacá, Maués e Aripuanã
<b>F</b>	<i>Potamotrygon motoro</i>
<b>G</b>	<i>P. orbignyi</i>
<b>H</b>	<i>P. scobina</i> + <i>P. aff. Scobina</i>
<b>I</b>	<i>Potamotrygon motoro</i> e exclusão de <i>P. sp. assacu</i> , <i>P. sp. marajo</i>
<b>J</b>	<i>P. orbignyi</i> e exclusão de <i>P. sp. assacu</i> , <i>P. sp. marajo</i>
<b>K</b>	<i>P. scobina</i> + <i>P. aff. scobina</i> e exclusão de <i>P. sp. assacu</i> , <i>P. sp. marajo</i>

### **Discordância biogeográfica**

Foi observado, qualitativamente, se casos de polifiletismo e parafiletismo estão associados ao compartilhamento de haplótipos entre populações simpátricas de espécies diferentes.

### **Isolamento completo vs. divergência com fluxo gênico**

Uma vez que a incongruência entre árvores filogenéticas e taxonomia pode ser resultado de hibridação, o nível de fluxo gênico entre as espécies *P. motoro*, *P. orbignyi*, e *P.*

*scobina+P. aff. scobina* foi estimado no programa IMa2, que ajusta um modelo de coalescência de isolamento com migração. Escolheram-se essas três espécies porque são as únicas que apresentam número amostral considerável ( $N > 8$ ) e têm ampla distribuição populacional. Os parâmetros foram estimados entre as espécies tomadas par-a-par, embora o programa permita estimativa dos parâmetros para mais de duas espécies ao mesmo tempo, mas que, para isso, necessita da inclusão de uma hipótese da relação filogenética entre as espécies, o que não pôde ser inferida a partir das árvores politômicas geradas.

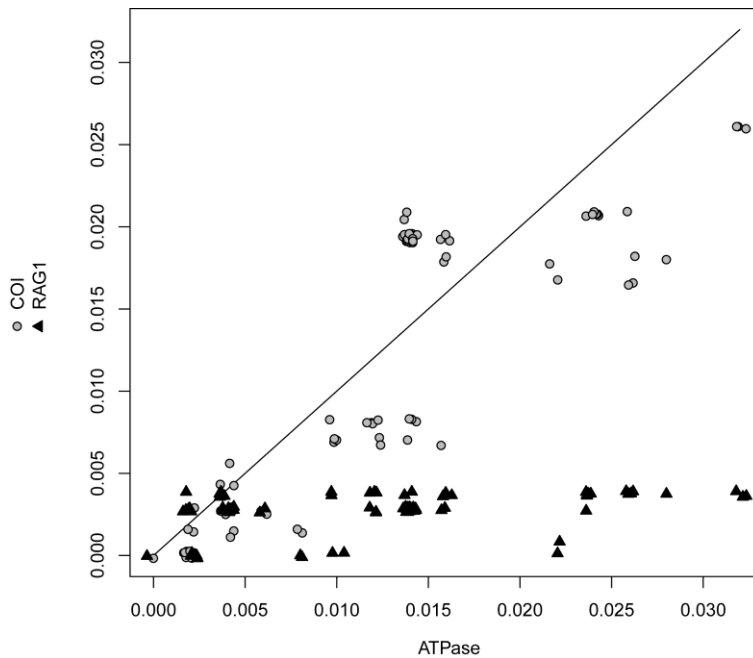
O IMa2 gera estimativas de seis parâmetros populacionais a partir da simulação de genealogias por MCMC: o tempo de divergência ( $t$ ), tamanho populacional ( $\Theta_1$ ,  $\Theta_2$ , e ancestral  $\Theta_A$ ), e taxas de migração ( $m_1$  e  $m_2$ ) entre duas populações que compartilham ancestral comum mais recente. Primeiro, o programa foi executado no modo “*MCMC mode*”, com o modelo completo de seis parâmetros. Em seguida foi feito o teste *likelihood ratio test* (LLR) implementado na opção “*Load Trees Mode*” no qual modelos mais simples foram comparados com o modelo completo. Os modelos testados foram: ausência de migração nas duas direções, com quatro parâmetros ( $t, \Theta_1, \Theta_2, \Theta_A$ ), migração igual entre as espécies, com cinco parâmetros ( $t, \Theta_1, \Theta_2, \Theta_A, m_1 = m_2$ ), e ausência de migração em uma das direções ( $t, \Theta_1, \Theta_2, \Theta_A, m_1, m_2 = 0$ ) e ( $t, \Theta_1, \Theta_2, \Theta_A, m_1 = 0, m_2$ ). Os parâmetros não foram estimados em escala demográfica, pois o interesse é testar somente se houve migração. Para escolha preliminar dos *priors* foram escolhidos valores bem amplos, que foram diminuídos em corridas posteriores de acordo com as curvas de probabilidade posteriores. A corrida completa foi feita por 10 milhões de passos amostrados a cada 100, com 20 correntes *metropolis-coupled* aquecidas por modelo geométrico com os termos  $ha = 0,90$  e  $hb = 0,85$ , e *burn-in* de 1 milhão de passos. Para assegurar boa amostragem do espaço de probabilidades posteriores, foi monitorado o tamanho efetivo amostral, os gráficos de

tendência dos parâmetros e a convergência dos valores entre os SET0 e SET1.

## 4. Resultados

### *Varição genética*

Foram sequenciadas 90 sequências, perfazendo um total de 2471 nucleotídeos, sendo 500, 736 e 1235 nucleotídeos para os genes ATPase, COI e RAG1, respectivamente. Destes, 71, 78 e 10 foram informativos para parcimônia, incluindo o grupo externo, e 52, 52 e 8, excluindo o grupo externo, para a ATPase, COI e RAG1, respectivamente. Um indel de três pares de base no gene ATPase nas sequências de *Paratrygon aiereba* foi tratado como dados ausentes. Embora visualmente a ATPase pareça apresentar taxa de substituição mais alta que COI (Fig. 2.4), não foi detectada diferença significativa ( $t = 0,7544$ ,  $P = 0.4517$ ); enquanto que ambas evoluem mais rápido que o RAG1 (COI vs RAG1,  $t = 9,3776$ ,  $P < 0,0001$ ).



**Figura 2.4.** Gráfico de dispersão de distância par-a-par não corrigida para ATPase vs. COI e RAG1. A linha representa  $x=y$  para a ATPase. Pontos abaixo dessa linha indicam taxa de substituição mais lenta. ATPase e COI parecem não estar evoluindo a taxas diferentes ( $t = 0.7544$ ,  $P = 0.45$ ) mas ambas evoluem significamente mais rápido que o RAG1 (COI vs RAG1,  $t = 9,3776$ ,  $P < 0,0001$ ).

### ***Congruência entre DNAm<sub>t</sub>, nuclear e taxonomia***

O teste de partição ILD não identificou diferença significativa entre a topologia das árvores mitocondriais ATPase e COI ( $P = 0,6666$ ), e assim, seus dados foram combinados para aumentar a quantidade de informação para a reconstrução da filogenia. Houve diferença significativa entre as topologias mitocondrial e nuclear do RAG1 ( $P = 0,0192$ ) sugerindo que apresentam histórias evolutivas distintas. Todas as hipóteses de monofiletismo testadas para as árvores mitocondriais pelos testes *bootstrap* paramétrico AU e teste SH foram significativamente inferiores que a árvore ótima não forçada (Tabela 2.2). Em contrapartida,



uma árvore não forçada de RAG1 apresentou clados bem mais próximos aos grupos taxonômicos conhecidos (Fig. 2.5). De acordo com o teste AU, seus dados foram compatíveis com o monofiletismo de *P. scobina* (independente da presença dos morfotipos *P. sp. assacu* e *P. sp. marajo*). Para o teste SH, mais conservador, os dados do RAG1 geram árvores compatíveis com a hipótese B e outras menos inclusivas. A hipótese B apresenta monofiletismo de todas as espécies estudadas com a exclusão das populações de *P. orbignyi* do Maués e Tarauacá e dos morfotipos *P. sp. assacu* e *P. sp. marajo*.

Tabela 2.2 Hipóteses filogenéticas testadas contra árvore ML ótima não forçada por meio dos testes AU e SH. Resultado dos testes AU e SH quanto à diferença entre topologias alternativas baseadas nas hipóteses da tabela 2.1 e melhor árvore ML para os dados de RAG1 e DNAm<sub>t</sub>, respectivamente. Valores em negrito são significativos a 5%. DL = diferença do *log-likelihood*; AU = probabilidade do teste AU; SH = probabilidade do teste SH.

Hipótese	DL	AU	SH	DL	AU	SH
	RAG			DNAm <sub>t</sub>		
Ótima	(-2449,1)	-	-	(6123,9)	-	-
A) todos	-33,1	<b>0,004</b>	<b>0,047</b>	-325,5	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>
B) – assacu, marajo	-24,3	<b>0,003</b>	<b>0,035</b>	-288,9	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>
C) (mot,orb,sco) – assacu, marajo	-24,3	<b>0,003</b>	<b>0,035</b>	-288,9	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>
D) B – pops. Orbignyi	-15,2	<b>0,009</b>	0,061	-191,6	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>
E) C – pops. Orbignyi	-15,2	<b>0,010</b>	0,062	-191,6	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>
F) motoro	-24,3	<b>0,003</b>	<b>0,042</b>	-141,811	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>
G) orbignyi	-9,2	<b>0,031</b>	0,311	-214,836	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>
H) scobina	0,0	0,487	0,876	-80,520	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>
I) hipótese F – assacu, marajo	-24,3	<b>0,003</b>	<b>0,04</b>	-140,093	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>
J) hipótese G – assacu, marajo	-9,2	<b>0,031</b>	0,202	-214,789	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>
K) hipótese H – assacu, marajo	0,0	0,533	0,859	-81,992	<b>&lt;0,001</b>	<b>0</b>

### **Análise filogenética dos dados combinados de DNAm<sub>t</sub>**

A árvore mitocondrial é caracterizada pela falta de resolução na relação entre as

espécies e extenso compartilhamento de haplótipos, com múltiplos casos de compartilhamento entre populações simpátricas de espécies distintas (Fig 5A). De todas as espécies e morfotipos analisados, as espécies *P. falkneri*, *P. henlei* e *P. leopoldi* e o morfotipo *P. sp. assacu* são os únicos monofiléticos, com alto suporte estatístico. Entretanto, não foram coletadas outras espécies simpátricas às duas primeiras (embora existam), o que impossibilita qualquer conclusão acerca de hibridação local; e *P. leopoldi*, embora monofilética, apresenta haplótipos aninhados a haplótipos de *P. orbignyi* pertencentes a indivíduos coletados no mesmo rio Xingu. As espécies simpátricas *P. sp. 2* e *P. sp. azul* formam um clado com bom suporte e compartilham haplótipo (único para *P. sp. azul* e o mais frequente para *P. sp. 2*). As espécies *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. scobina* compartilham haplótipos extensivamente. Essas três espécies se distribuem na planície amazônica e, portanto, tem potencial para possuírem grande tamanho populacional efetivo devido à extensão geográfica da área, de forma que ILS poderia ser o fator responsável pelo compartilhamento de haplótipos e polifiletismo. Entretanto, há múltiplas instâncias de haplótipos geograficamente compartilhados entre essas espécies, o que sugere hibridação. Clados nos quais existe esse compartilhamento geográfico de haplótipos entre espécies estão evidenciados na Fig. 2.5A na forma de grupos definidos *sensu lato*.

*P. motoro* apresenta uma divisão profunda entre seus haplótipos, a grosso modo definida geograficamente entre populações a leste e oeste de região próxima ao médio Amazonas/Negro (Grupos Leste e Oeste Figs. 5 e 5A). Indivíduos do grupo Oeste compartilham haplótipos com *P. orbignyi* do Tarauacá (inclusive com indivíduos simpátricos de *P. motoro*). Indivíduos de *P. motoro* do grupo Leste compartilham haplótipos com várias espécies e morfotipos. No rio Negro, compartilham haplótipos com populações simpátricas de *P. orbignyi* e com indivíduos de *P. aff. scobina* da Bacia do Orinoco; *P. sp. marajo* também

integra esse grupo (denominado Negro+Orinoco).

*P. orbignyi* do rio Jari compartilha um haplótipo com indivíduos de *P. scobina* da boca do Amazonas, haplótipo esse que é muito próximo ao de *P. scobina* coletado simpatricamente no rio Jari. Dois indivíduos de morfotipo similar (aqui denominado *P. sp. assacu*) coletados em rios distintos (Jari e Araguari) formam clado com alto valor de bootstrap, o que proporciona suporte à hipótese de se tratar de uma nova espécie. Todos os indivíduos desse grupo ocorrem em rios que drenam o Escudo das Guianas (Jari e Araguari), ou a boca do Amazonas, próximos geograficamente e daí a origem do nome do grupo (denominado Escudo das Guianas).

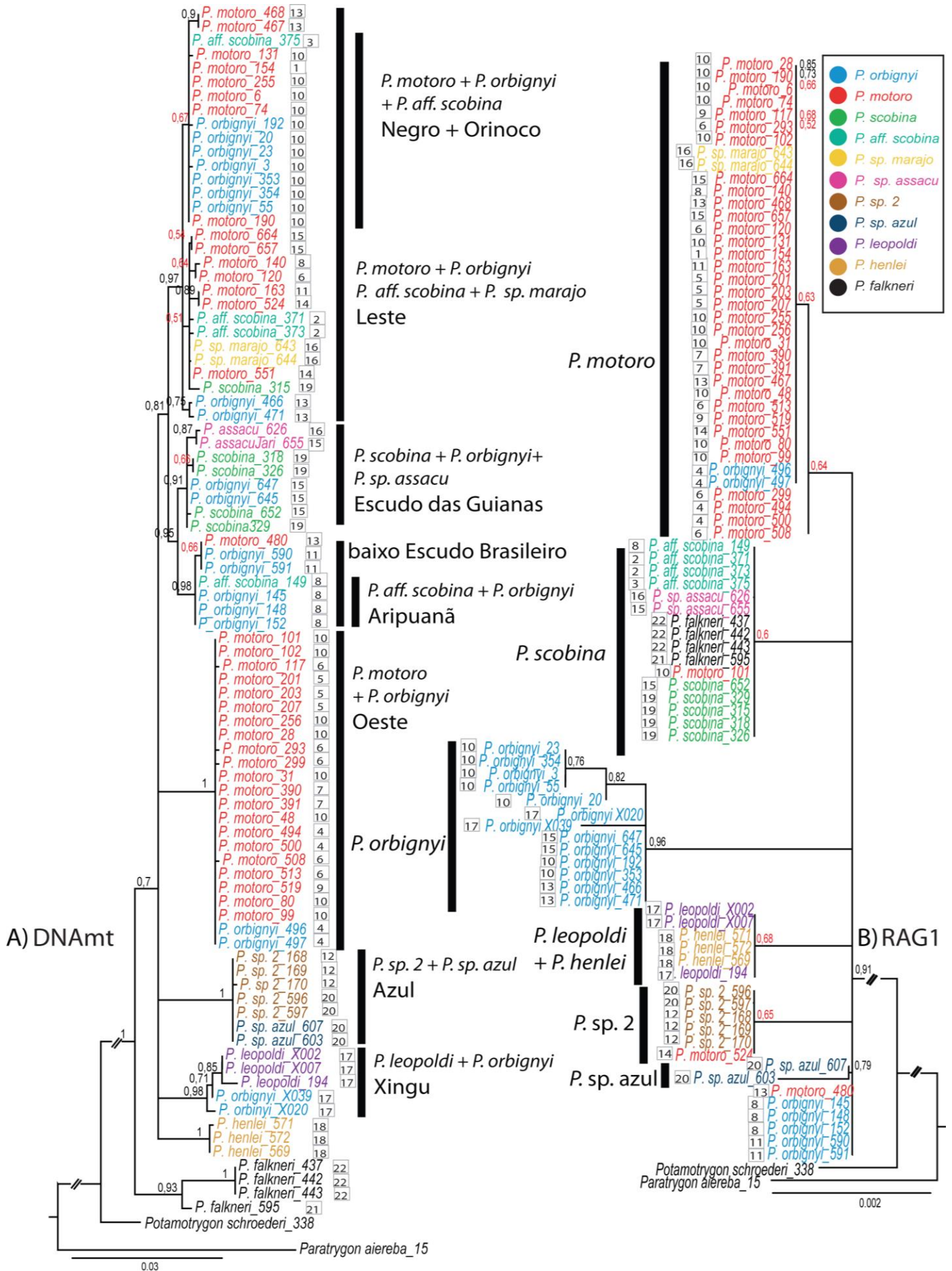
Haplótipos de *P. motoro* do baixo Tapajós, *P. orbignyi* de Maués e Aripuanã e *P. aff. scobina* do Aripuanã formam um clado bem suportado que denominei de baixo Escudo Brasileiro devido às localidades estarem nas bordas desse escudo cristalino. *P. orbignyi* e *P. aff. scobina* compartilham haplótipos simpatricamente no rio Aripuanã.

### **Análise filogenética do gene nuclear RAG1**

Como a mitocondrial, a árvore do RAG1 apresenta baixa resolução na relação entre as espécies e múltiplas instâncias de polifiletismo. Entretanto, ela difere porque parece não haver relação entre o compartilhamento de haplótipos e proximidade geográfica, mas sim há estrutura filogenética em maior conformidade com a taxonomia baseada em morfologia (como mostra os testes AU e SH, Fig. 5B, Tabela 2.2). Por isso, foram evidenciados grupos baseados na taxonomia, diferentemente da árvore mitocondrial (Fig. 2.5B). Os suportes de bootstrap são em geral menores que os da árvore mitocondrial, o que é esperado pela menor taxa evolutiva e quantidade de sítios informativos (Fig. 2.4). A árvore está estruturada em

seis grupos principais, aqui denominados conforme a espécie mais representativa: *P. motoro*; *P. orbigny*, *P. scobina*; *P. orbigny*; *P. leopoldi* + *P. henlei*; *P. sp. 2* e *P. sp. azul*.

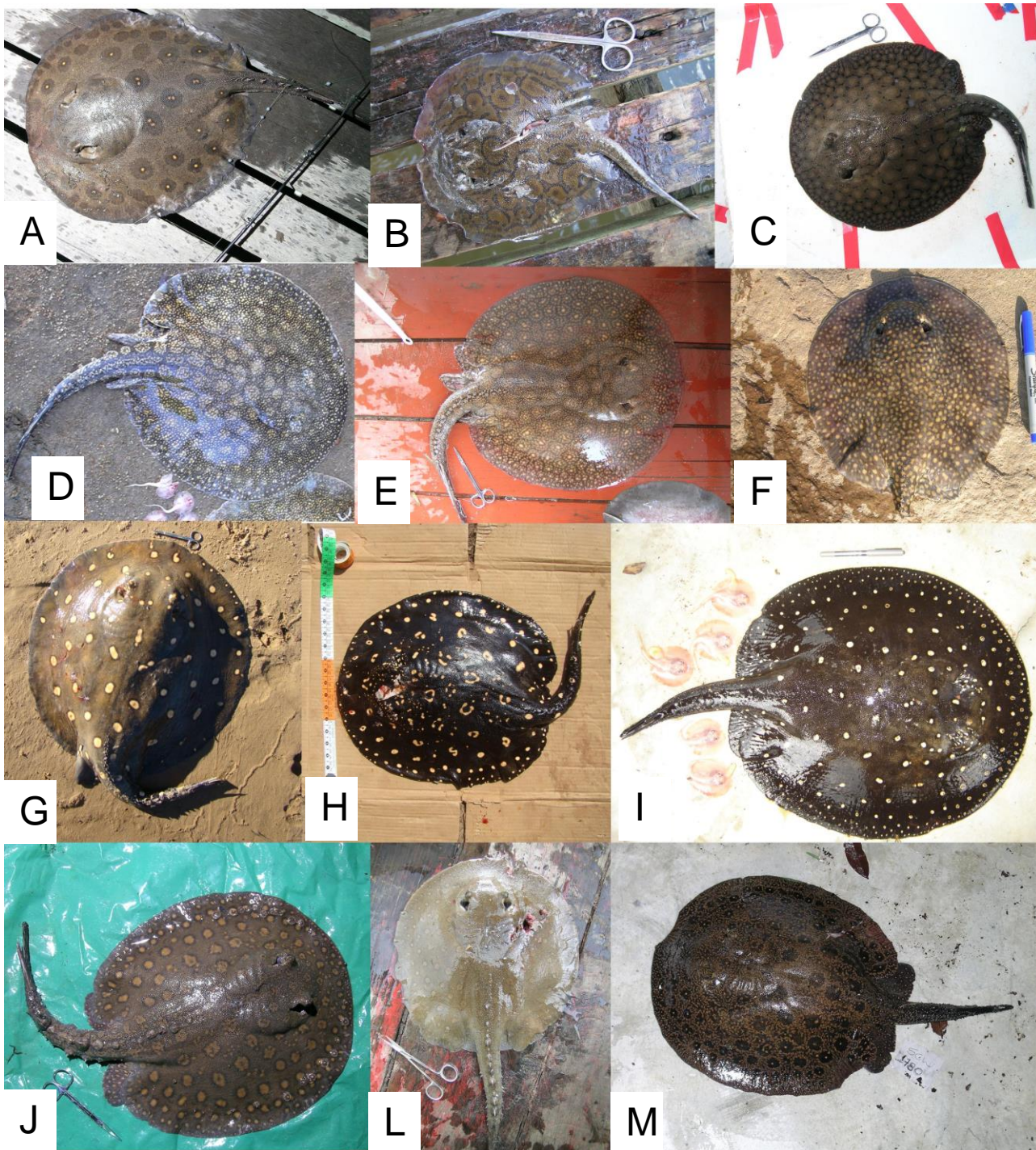
A espécie *P. motoro* forma um grupo praticamente monofilético, compartilhando haplótipos somente com *P. orbigny* de Maués e o morfotipo *P. sp. marajo* (denominado *P. motoro*). Os outros haplótipos de *P. motoro* não contidos nesse grupo estão em clados junto com indivíduos de outras espécies, mas que não são simpátricos (indivíduos 101, 524 e 480, Fig. 2.5b). De forma parecida, *P. orbigny* apresenta grupo monofilético constituído por indivíduos de várias localidades geográficas distintas (denominado *P. orbigny*), em forte contraste com o padrão observado na árvore mitocondrial. Populações de Maués e Aripuanã não foram resolvidas em nenhum grupo. O grupo *P. scobina* abarca espécies com padrões de coloração similares e regiões geográficas diferentes, sugerindo origem comum. (Fig. 2.6). *P. leopoldi* e *P. henlei* formam clado monofilético embora ocorram em bacias hidrográficas distintas (Xingu e Tocantins, respectivamente). A morfologia e padrão de coloração entre essas espécies são similares, a exemplo das espécies do grupo *P. scobina*, sugerindo origem comum desses caracteres derivados de ancestral comum mais recente. (Fig. 2.6). *P. sp. azul* forma grupo monofilético; enquanto que *P. sp. 2* compartilha um haplótipo com a espécie alopátrica *P. motoro*.



A), e RAG1 (B). Números sobre os ramos são valores de bootstrap (em vermelho, valores abaixo de 70). As barras verticais pretas na frente dos cladogramas e os nomes atribuídos a ela representam as espécies/morfotipos conforme definido por taxonomia e padrão de coloração. As barras presentes na árvore mitocondrial que apresentam nomes de localidade geográfica (e.g. rios e grandes áreas como Oeste - Bacia Amazônica Oeste e Escudo das Guianas - rios que drenam esse escudo), apontam proximidade filogenética entre indivíduos de espécies diferentes que ocorrem em simpatria. Ver texto para detalhes.

### ***Modelo de Isolamento com Migração por coalescência***

Para testar se a causa da incongruência entre topologias e morfologia deve-se a fluxo gênico, foi ajustado um modelo de isolamento com migração por coalescência. As curvas de probabilidade posterior do tamanho ancestral ( $q_{anc}$ ) são mais amplas e achatadas que as das populações do presente, como esperado para população ancestral que viveu há muito tempo no passado (Won e Hey, 2005). De forma similar, a curva dos  $t$  apresentaram trajetórias achatadas e com múltiplos picos, ou crescentes até os limites estabelecidos para os *priors*, de forma que não se pode ter uma estimativa confiável para esse parâmetro (Figs. 7,8 e 9). Esse padrão é característico de populações evoluindo próximo ao modelo de ilhas, i.e., as populações estariam em equilíbrio entre deriva e migração constantes (Nielsen e Wakeley, 2001), embora possa ser simplesmente falta de mais dados (sítios informativos e número de locus, Hey, 2010). Entretanto, as curvas para taxa de migração populacional ( $2Nm$ ), parâmetro de interesse para avaliar se ocorre hibridação, apresentam padrão esperado na forma de sino, embora com variância ampla, como esperado para análises de locus único, de forma que são informativas para esse parâmetro (Nielsen e Wakeley, 2001). Um sumário dos parâmetros está apresentado na Tabela 2.3. A fim de se testar se o fluxo gênico entre as

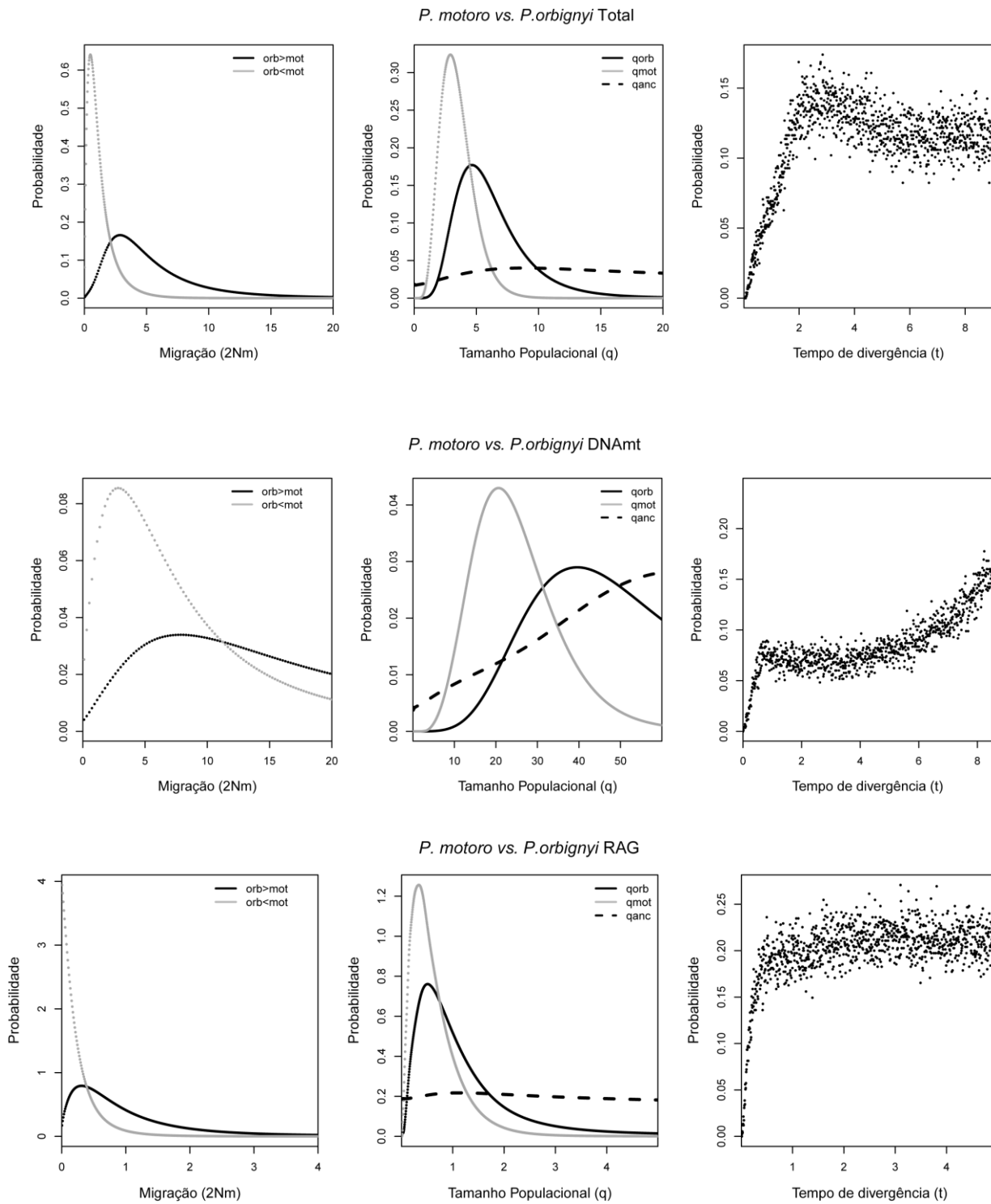


**Figura 2.6.** Clados da árvore para o gene RAG1 paraofiléticos ou polifiléticos, agrupam espécies de bacias hidrográficas diferentes, mas padrão de coloração similar A) *P. motoro*, rio Araguari; B) *P. sp. marajo*, rio Araguari; C) *P. orbignyi*, rio Jari; . Grupo *scobina*: D) *P. aff. scobina*, rio Caura; E) *P. aff. scobina*, rio Jari; e F) *P. falkneri*, rio Cuiabá. Grupo *leopoldi+henlei*: G) *P. henlei*, rio Araguaia; H) *P. leopoldi*, rio Suiá-Miçu; I) *P. sp. azul*, rio Azul; Grupo *assacu* J) *P. sp. asscu*, rio Jari; L) *P. sp. asscu*, rio

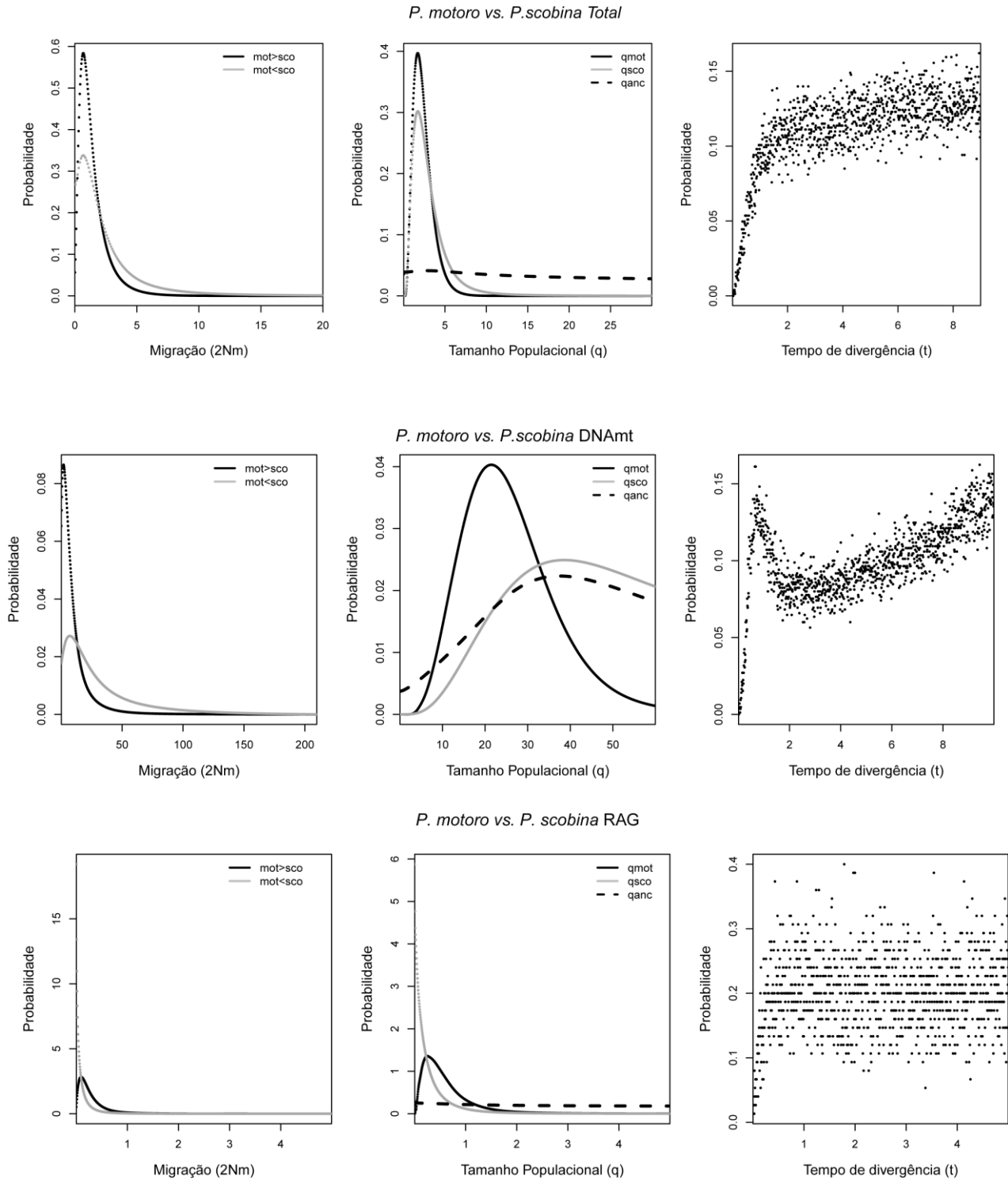
Araguari; M) *P. s.* sp. 2, rio Azul.

espécies é significativamente diferente de zero e, em caso afirmativo, se há uma direção preferencial, foi usado o teste LLR implementado no modo L do IMA2 (Tabela 2.4). A hipótese de ausência de fluxo gênico entre as três espécies foi rejeitada tanto para a evidência conjunta dos genes mitocondriais e nuclear, quanto para os genes em separado, com exceção para o fluxo gênico entre *P. motoro* e *P. orbigny* que não foi estatisticamente diferente de zero somente para o RAG1. Entretanto, o fluxo gênico mitocondrial é bem maior que o nuclear (Tabela 2.3). Não foi rejeitada a hipótese de fluxo gênico igual em ambas as direções tanto para os genes combinados como separados, com exceção do contraste com os genes combinados entre *P. orbigny* e *P. scobina*. Entretanto, nesse contraste não foram rejeitadas ambas as hipóteses de migração em um único sentido, tanto de *P. orbigny* para *P. scobina*, quanto no sentido inverso, de forma que provê suporte para fluxo gênico entre *P. scobina* e *P. orbigny* para os dados combinados, uma vez que ambos os sentidos de fluxo gênico são suportados. Esses resultados em conjunto sugerem que há fluxo gênico em ambas as direções entre as três espécies, embora o fluxo gênico do DNAm<sub>t</sub> seja bem mais alto do que o RAG1.

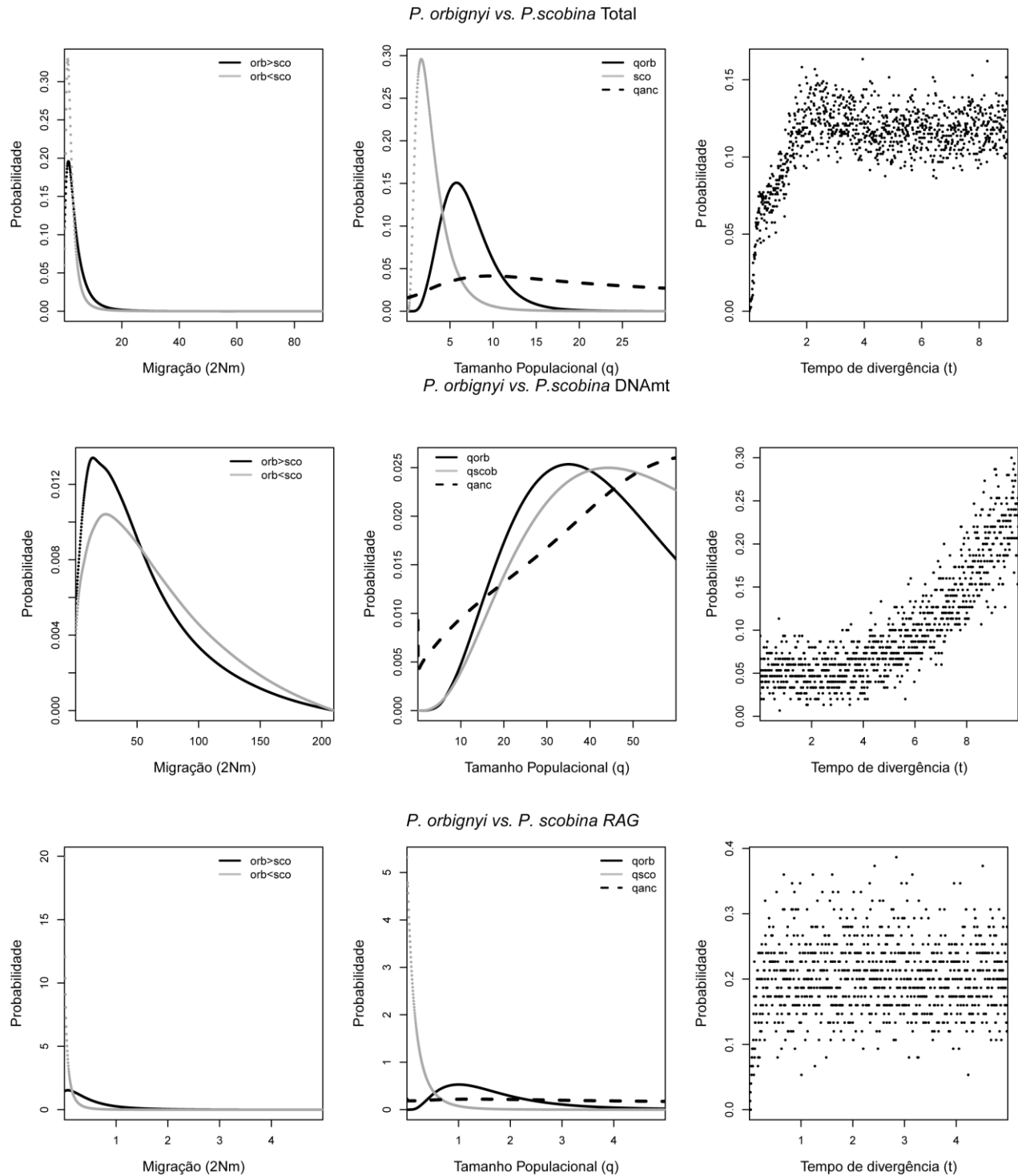




**Figura 2.7.** Curvas de probabilidade posterior dos parâmetros populacionais estimados no IMA2 para *P. orbigny* vs. *P. motoro*. Direção da migração mostrada no sentido da coalescência.



**Figura 2.8** Curvas de probabilidade posterior dos parâmetros populacionais estimados no IMA2 para *P. motoro* vs. *P. scobina*. Direção da migração mostrada no sentido da coalescência.



**Figura 2.9** Curvas de probabilidade posterior dos parâmetros populacionais estimados no IMA2 para *P. orbignyi* vs. *P. scobina*. Direção da migração mostrada no sentido da coalescência.

**Tabela 2.3** Estimativas dos parâmetros demográficos obtidos com o IMA2 entre pares de espécies (intervalo de probabilidade posterior a 95% em parênteses). A primeira espécie no título é representada por 0, e a segunda por 1.

	<b>Total</b>	<b>Mitocondrial</b>	<b>RAG1</b>
	HiPt (Lo-Hi)	HiPt (Lo-Hi)	HiPt (Lo-Hi)
<b><i>P. orbignyi vs. P. motoro</i></b>			
t	2,849 (1,165-?)	9,875 (0,5650-?)	3,103 (0,4075-?)
q0	4,665 (1,695-12,29)	39,57 (20,31-59,97 )#	0,5125 (0,05750-3,103)#
q1	2,925 (1,155-6,165)	20,67 (7,47-45,45)	0,3375 (0,03250-1,603 )#
q2	8,685 (2,385-?)	59,97 (8,550-59,97)#	1,133 (0,0-4,723)#
m0>1	1,167 (0,1170-?)	0,4445 (0,04,715)#	1,45 (0,3820-3,998)#
m1>0	0,219 (0-?)	0,1855 (0,0-4,266)#	0,002 (0,0-3,194)#
2N0m0>1	2,834 (0,2249-14,17)#	7,871 (0,0-91,83)#	0,3048 (0,0-3,493)#
2N1m1>0	0,4887 (0,0-3,526)#	2,834 (0,0-40,19)#	0,004997 (0,0-0,8546)#
<b><i>P. motoro vs. P. scobina</i></b>			
t	8,941 (0,9855-?)	9,435 (0,3750-9,995)?	1,788 (0,2425-?)
q0	1,725 (0,465-4,725)	21,45 (7,23-46,65)	0,2475 (0,02250-1,712)#
q1	1,725 (0,3450-7,425)#	38,61 (16,17 -59,97 )#	0,0025 (0,0-1,163)#
q2	2,805 (0,0-28,18)	37,47 (8,910 -59,97)#	0,0225 (0,0-4,718)
m0>1	0,477 (0,0-4,149)	0,0735 (0,0-3,994 )#	0,833 (0,2050-1,999)
m1>0	0,003 (0,0-4,875 )	0,5355 (0,0-5,128 )#	0,001 (0,0-1,867)
2N0m0>1	0,6918 (0,0-3,684 )	1,994 (0,0-34,53)#	0,09745 (0,0-0,9170)#
2N1m1>0	0,6747 (0,0-8,591)	7,031 (0,0-101,5)#	0,002499 (0,0-0,4873)#
<b><i>P. orbignyi vs. P. scobina</i></b>			
t	3,946 (0,7515-?)	9,735 (0,01500 -?)	2,842 (0,1575-?)
q0	5,775 (1,965-13,21)	29,98 (14,85-59,97 )#	1,008 (0,2325-3,678)#
q1	1,695 (0,3750-7,365 )	29,98 (15,75 -59,97 )#	0,0025 (0,0-0,8225)#
q2	9,705 (2,535 -29,98 )	29,98 (0,0-59,97)?	0,0025 (0,0-4,707)#
m0>1	0,351 (0,0-3,957 )	0,849 (0,0-6,542)#	0,001 (0,0-1,713)#
m1>0	0,891 (0,0-5,061)	1,233 (0,2485-6,814)#	0,001 (0,0-1,867)#
2N0m0>1	1,394 (0,0-11,92 )	14,17 (0,0-135,9)#	0,06747 (0,0-1,622)#
2N1m1>0	1,214 (0,0-7,871)	24,45 (0,0-150,0)#	0,002499 (0,0-0,3523)#

? parâmetro tem múltiplos picos

# A probabilidade posterior não atingiu valores de 0 ou próximo de zero.

Tabela 2.4 Teste de modelos aninhados. por *log-likelihood ratio test*.  
Significância estatística evidenciada em negrito.

Modelo	total			DNamt			RAG1		
	log(P) <sup>a</sup>	g.l. <sup>b</sup>	2LLR <sup>c</sup>	log(P)	g.l. †	2LLR	log(P)	g.l. †	2LLR
<b><i>P. orbigny</i> vs. <i>P. motoro</i></b>	-6,435	-	-	-10,2	-	-	-1,589	-	-
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} = m_2$	-6,193	1	-0,483	-10,38	1	0,3633	-2,428	1	1,678
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} = 0 m_2$	-10,88	1*	<b>8,899**</b>	-12,9	1*	<b>5,404*</b>	-3,125	1*	<b>3,072*</b>
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} m_2 = 0$	-6,718	1*	0,5673	-12,03	1*	<b>3,656*</b>	-1,589	1*	0
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} m_2 = 0$	-70,2	2*	<b>128,01***</b>	-16,44	2*	<b>12,12***</b>	-3,125	2*	1,394
<b><i>P. motoro</i> vs. <i>P. scobina</i></b>	-4,043	-	-	-10,98	-	-	1,497	-	-
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} = m_2$	-5,483	1	2,881	-11,3	1	0,6339	1,171	1	0,6521
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} = 0 m_2$	-9,268	1*	<b>10,45***</b>	-11,3	1*	0,6289	0,4412	1*	2,112
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} m_2 = 0$	-5,83	1*	<b>3,575*</b>	-11,44	1*	0,9216	1,497	1*	0
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} m_2 = 0$	-26,98	2*	<b>42,99***</b>	-13,11	2*	<b>3,62*</b>	-1,619	2*	<b>5,58*</b>
<b><i>P. orbigny</i> vs. <i>P. scobina</i></b>	-5,876	-	-	-13,73	-	-	2,35	-	-
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} = m_2$	-7,858	1	<b>3,964*</b>	-13,73	1	0,01141	1,915	1	0,8701
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} = 0 m_2$	-5,876	1*	0	-14,18	1*	0,9083	-0,8581	1*	<b>6,417**</b>
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} m_2 = 0$	-4,65	1*	-2,452	-14,4	1*	1,352	2,35	1*	0
$\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} m_2 = 0$	-29,26	2*	<b>42,804***</b>	-16,28	2*	<b>5,107*</b>	-1,6	2*	<b>7,03**</b>

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

<sup>a</sup>Probabilidade log do IMA2.

<sup>b</sup>Graus de liberdade do modelo.

<sup>c</sup>Resultado log-likelihood ratio do IMA2; aproxima de distribuição chi-quadrado. O teste foi calculado da seguinte maneira: para  $\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} = m_2$  calcula-se 2LLR contra modelo seis parâmetros e segue distribuição chi-quadrado com 1 grau de liberdade e valor crítico  $P < 0,05$  se  $2LLR > 3,84$ ; para  $\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} = 0 m_2$  e  $\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} = m_1 0$  calcula-se 2LLR contra modelo seis parâmetros e  $\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} m_2 = 0$  contra modelo  $\theta_1\theta_2\theta_{Am_1} = m_2$ . Segue distribuição chi-quadrado igual a  $1/2 \times \text{chi-quadrado}(1) + 1/2 \times \text{chi-square}(0)$  e valor crítico  $P < 0,05$ ,  $0,01$  e  $0,001$  a  $2LLR > 2,70$ ,  $5,41$  e  $9,55$ , respectivamente.

## 5. Discussão

Esse capítulo busca esclarecer se a hibridação foi processo importante na história de diversificação das arraiais de água doce do grupo roseta-ocelado, ou se a falta de resolução e polifiletismo observados nas árvores filogenéticas deve-se fundamentalmente a sorteamento incompleto de linhagens, ou polimorfismos ancestrais. Para isso, foram contrastados dados do genoma nuclear com o mitocondrial que, por suas idiossincrasias, como herança uniparental, haploidia e ligação muito próxima entre seus genes, geram expectativas que podem ser usadas para separar efeitos de ILS dos de hibridização.

### ***Sorteamento incompleto de linhagens vs. hibridação***

Embora ambas as filogenias mitocondrial e nuclear apresentem baixa resolução na relação entre as espécies e polifiletismo, a árvore nuclear foi mais compatível com a taxonomia aceita do grupo baseada em morfologia. Esse resultado é o oposto do predito pela teoria da coalescência para alelos neutros, uma vez que o monofiletismo ocorrerá em média, quatro vezes mais rápido para DNAm<sub>t</sub> do que para marcadores autossômicos, proporcionalmente à diferença no tamanho efetivo desses genomas (Moore, 1995; Hudson e Coyne, 2002). A maior resolução da árvore RAG1 também não pode ser atribuída a erros na reconstrução da topologia correta oriundos da falta de caracteres informativos, uma vez que foram sequenciados um número equivalente de pares de bases entre DNAm<sub>t</sub> (1236) e RAG1 (1236) e o RAG1 apresenta taxa de evolução molecular significativamente menor que DNAm<sub>t</sub>, como é comum para genes nucleares codificantes (Pamilo e Nei, 1988). Entretanto, devido à estocasticidade do processo de coalescência, não se pode rejeitar a hipótese

menos provável de marcadores autossômicos gerarem topologias mais resolvidas (Hudson e Turelli, 2003). Além disso, outros processos evolutivos podem acarretar em árvore mitocondrial menos resolvida, como seleção balanceadora agindo no DNAm desacelerando a coalescência, ou seleção direcional atuando sobre o RAG1 (ou região ligada) acelerando a coalescência; ou ainda dispersão enviesada de fêmeas (Hudson e Coyne, 2002; Toffoli *et al.*, 2008). Entretanto, o compartilhamento de haplótipos interespecíficos geograficamente localizados, aliados a discordância biogeográfica entre haplótipos nucleares e mitocondriais é considerado como prova inequívoca de fluxo gênico interespecífico ocorrendo no presente ou que ocorreu recentemente, já que polimorfismos ancestrais teriam igual probabilidade de estar presentes em todas as populações à medida que as espécies recém-criadas colonizassem novas áreas geográficas (Funk e Omland, 2003; Toffoli *et al.*, 2008). A árvore mitocondrial revelou compartilhamento interespecífico de haplótipos geograficamente localizados em todas as espécies analisadas das quais foram amostradas espécies simpátricas. Em contrapartida, a árvore nuclear não evidenciou nenhum padrão claro de discordância biogeográfica, mas clados polifiléticos agrupando espécies e morfotipos com morfologia e padrão de coloração similares, o que indica que o polifiletismo deve-se a polimorfismo ancestral herdado de ancestral, que transmitiu caracteres morfológicos às espécies descendentes. A falta de caracteres informativos e tamanho efetivo seriam as principais causas do polifiletismo.

Dessa forma, contrastando as topologias mitocondrial e nuclear, conclui-se que houve múltiplos eventos de introgressão, preferencialmente do genoma mitocondrial, e que a falta de resolução da árvore RAG1 deve-se principalmente a ILS.

A ocorrência de introgressão foi corroborada pelo modelo de isolamento com migração do programa *Ima2*, que apontou fluxo gênico significativo entre as três espécies analisadas

(*P. motoro*, *P. orbigny* e *P. scobina*) em ambas as direções. O modelo sugere que a introgressão ocorreu tanto para os genes mitocondriais quanto para o RAG1, embora tenha sido muito mais alta para o primeiro, corroborando as conclusões obtidas das análises das topologias. A grande amplitude das curvas de probabilidade posterior para o parâmetro tamanho ancestral e a curva achatada na cauda à direita do parâmetro tempo sugerem que o fluxo gênico vem ocorrendo há bastante tempo entre as espécies, atingindo equilíbrio com deriva, próximo a um modelo de ilhas. Em populações que apresentam fluxo gênico contínuo por muito tempo, a maioria dos eventos de coalescência ocorrerão em tempo anterior à separação dessas populações de forma que o ajuste de modelo de isolamento com migração irá gerar estimativas enviesadas, com grande proporção da probabilidade posterior recaindo sobre tempos cada vez mais antigos, gerando curva de probabilidade do parâmetro  $t$  com cauda achatada na direção de tempos mais antigos. Entretanto, esse padrão pode dever-se a falta de dados, de forma que os resultados podem não ser confiáveis e, portanto, devem ser vistos com cautela (Hudson e Coyne, 2002).

### ***Radiação e fronteira entre espécies***

As árvores filogenéticas inferidas tanto de dados mitocondriais quanto nucleares apresentaram comprimentos de ramo curtos entre nós internos, padrão condizente com processo de radiação recente no tempo, no qual o pouco tempo entre os eventos de especiação impede que a coalescência dos alelos resolva as relações (Poe e Chubb, 2004). Essa radiação começou c.a. 2,4 milhões de anos atrás originando ao menos 10 espécies, entre espécies já descritas ou em descrição (obs. pess.) e morfotipos com padrão morfológico e de coloração intermediários, sugerindo fenótipos de origem híbrida (Maurício



Pinto de Almeida, com. pess.; obs.pess.). O contraste entre as filogenias permite considerações a respeito da fronteira entre as espécies. A árvore RAG1 apresenta três clados, embora com baixo suporte, denominados *P. motoro*, e *P. scobina* e *P. orbigny* (este com alto suporte) que parecem ser congruentes com padrões de cor distintos (Fig. 2.5) e possivelmente ocupam nichos ecológicos diferentes (e.g. Rincon, 2006; Almeida *et al.*, 2010). *P. falkneri*, a única espécie coletada da Bacia do Paraguai-Paraná apresenta-se como espécie-irmã das demais na árvore de DNAmT com certo suporte estatístico, implicando que a colonização dessa bacia hidrográfica teria antecedido a diversificação do grupo. Entretanto a árvore RAG1 a coloca junto com o clado *P. scobina*. Dado a semelhança morfológica entre *P. falkneri* e *P. scobina*, o fato de múltiplos eventos de hibridização detectados do DNAmT e o fato de que as relações filogenéticas inferidas na árvore do RAG1 serem mais compatíveis com a morfologia, eu provisoriamente apoio a relação filogenética suportada pela árvore RAG1. Eventos de hibridação diminuem a distância genética entre espécies e podem causar incongruência entre árvore de genes e espécies quando espécies não-irmãs estão envolvidas. O fato de *P. falkneri* estar isolada em outra bacia hidrográfica impede qualquer hibridação com as espécies da Bacia Amazônica. O indivíduo *P. motoro* 101 agrupou-se com *P. motoro* na árvore mitocondrial, mas com *P. scobina* na árvore do RAG1. A semelhança morfológica e padrão de coloração sugere ser *P. scobina*, sendo o primeiro registro conhecido de ocorrência dessa espécie na Bacia do rio Negro (ver foto no Capítulo 3). Indivíduos denominados *P. sp. assacu* formaram grupo com bom suporte na árvore DNAmT, que por sua vez se relaciona com haplótipos de *P. scobina* do Jari e boca do Amazona e *P. orbigny* do Jari. Este grupo está relacionado ao clado *P. scobina* na árvore RAG1 e sugere que *P. sp. assacu* pode ser uma nova espécie proximamente relacionada a *P. scobina*, embora também possa se tratar de indivíduos híbridos com características morfológicas

similares adquiridas independentemente. Faz-se necessário maior amostragem para se definir posição taxonômica desse morfotipo. *P. sp. marajo* agrupa-se com *P. motoro* na árvore RAG1 e com clado *P. motoro* e *P. scobina* na árvore mitocondrial. Mais amostragem é necessária para se definir sua posição taxonômica. A relação de espécies irmãs entre *P. henlei* e *P. leopoldi* revelada pela árvore RAG1, de certa forma é corroborado por padrão de cor e hábitos similares embora ainda não quantificada, e vivem em bacias hidrográficas contíguas (Tocantins e Xingu, respectivamente). Tudo indica que ocorra (ou ocorreu) introgressão entre *P. leopoldi* e populações simpátricas de *P. orbigny*. O status de espécie é suportado pela árvore RAG1 para as simpátricas *P. sp. 2* e *P. sp. azul*, sendo que a primeira compartilha haplótipos com o indivíduo 524 da espécie alopátrica *P. motoro*, coletado no rio Amazonas próximo da foz do Tapajós, sugerindo ILS. Essas espécies compartilham haplótipos na árvore mitocondrial, sugerindo introgressão. *P. orbigny* coletada em Maués e Aripuanã (grupo Baixo Escudo Brasileiro na árvore mitocondrial) não se agrupou com os demais haplótipos de sua espécie na árvore RAG1 e compartilhou haplótipos com a simpátrica *P. aff. scobina* (149) e *P. motoro* (480) na árvore mitocondrial. Mais amostragem dessas populações se faz necessário para melhor posicionamento taxonômico.

### ***Implicação das hibridações múltiplas na radiação***

A maioria dos eventos reportados de radiação adaptativa são acompanhados por hibridação introgressiva, preferencialmente por DNAm (Seehausen, 2004 e referências contidas). O grupo roseta-ocelado representa um evento de radiação, embora não necessariamente adaptativa, uma vez que não foi demonstrado que as especiações surgiram

como resultado de seleção ecológica divergente (Schluter, 2000). De qualquer forma, na radiação do grupo roseta-ocelado puderam ser inferidos ao menos seis instâncias de hibridações independentes a partir do compartilhamento de haplótipos de DNAm<sub>t</sub> geograficamente localizados. Há basicamente dois processos evolutivos que podem explicar a transferência de haplótipos de DNAm<sub>t</sub> entre espécies: hibridação rara seguida de seleção de um dos haplótipos de maior valor adaptativo, ou por hibridação seguida de fixação por deriva genética (Shaw, 2002; Ballard e Whitlock, 2004). A seleção de haplótipos de uma das espécies parentais seria particularmente mais comum quando da invasão de novos habitats, com condições ambientais diferente das espécies parentais (Ballard e Whitlock, 2004). A radiação do grupo roseta-ocelado está associada à expansão geográfica, incluindo colonização de habitats diferentes, como águas de temperaturas variadas, de forma que genes mitocondriais relacionados à cadeia respiratória poderiam sofrer seleção.

Em contrapartida, caso barreiras de isolamento reprodutivo entre as espécies não forem muito fortes, pode ocorrer introgressão entre espécies para alelos neutros (Currat *et al.*, 2008). Essa introgressão será mais acentuada em populações em expansão e para alelos com menor fluxo gênico intraespecífico, como no caso do genoma mitocondrial que é transmitido maternamente e haploide, e dessa forma apresentando tamanho efetivo menor que o genoma nuclear (com algumas exceções, como cromossomos sexuais hemizigóticos). Assim, caso o valor adaptativo do híbrido ou de indivíduos introgrididos seja superior ao dos parentais devido a outras combinações gênicas que não oriundas do genoma mitocondrial, este introgridirá mais rapidamente, mesmo com um menor fluxo gênico do que um gene nuclear. Isso explicaria a maior discordância encontrada entre a árvore filogenética mitocondrial e a taxonomia baseada em morfologia, do que esta com a árvore do RAG1. O genoma mitocondrial teria apresentado múltiplos e mais acentuados eventos de introgressão

porque apresenta tamanho efetivo populacional menor e, portanto, maior probabilidade de fixação em populações em expansão geográfica, conforme hipotetizado para as arraias de água doce da família Potamotrygonidae (Currat *et al.*, 2008, Capítulo 1).

Vários estudos mostram que a maioria dos genótipos híbridos tem valor adaptativo inferior aos parentais em seus locais de ocorrência, mas podem apresentar valor adaptativo superior em ambientes novos (Seehausen, 2004 e referências contidas). Eventos de radiação geralmente estão associados à invasão de novos ambientes, de forma que uma hibridação ocorrendo extensivamente entre espécies pertencentes ao grupo que sofreu radiação poderia facilitar a ocupação de novos picos adaptativos.

## 6. Bibliografia

ALEIXO, A. Historical diversification of a "terra-firme" forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. **Evolution**, v. 58, p. 1303-1317, 2004.

ALMEIDA-FILHO, R.; MIRANDA, F. P. Mega capture of the Rio Negro and formation of the Anavilhanas Archipelago, Central Amazônia, Brazil: Evidences in an SRTM digital elevation model. **Remote Sensing of Environment**, v. 110, p. 387–392, 2007.

ALMEIDA, M. P. et al. Diet of the freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) on Marajó Island (Pará, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 1, p. 155-162, 2010.

ARNOLD, M. L. et al. Natural hybridization as a catalyst of rapid evolutionary change. In: SINGH, R. S.; XU, J., et al (Ed.). **Rapidly Evolving Genes and Genetic Systems**. Oxford: Oxford University Press, 2012. cap. 25, p.256-265.

ARNOLD, M. L.; HODGES, S. A. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 67-71, 1995.

ARNOLD, M. L.; MARTIN, N. H. Hybrid fitness across time and habitats. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 9, p. 530-536, 2010.

ASSUMPÇÃO, M. The Regional Intraplate Stress Field in South America. **Journal of Geophysical Research**, v. 97, p. 11889-11903, 1992.

AUDEMARD, F. A. Geomorphic and geologic evidence of ongoing uplift and deformation in the Merida Andes, Venezuela. **Quaternary International**, v. 101-102, p. 43-65, 2003.

- AVISE, J. C. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B**, v. 312, p. 325-342, 1986.
- BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 729-744, 2004.
- BARRACLOUGH, T. G.; NEE, S. Phylogenetics and speciation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 7, p. 391-399, 2001.
- BENSASSON, D. et al. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 6, p. 314-321, 2001.
- BEZERRA, P. E. L. **Compartimentação Morfotectônica do Interflúvio Solimões-Negro**. 2003. 335 Centro de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém.
- BIRKY, C. W.; FUERST, P.; MARUYAMA, T. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effect of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. **Genetics**, v. 121, p. 613-627, 1989.
- BROOKS, D. R.; MCLENNAN, D. A. **Phylogeny, Ecology and Behavior**. Chicago, IL: University of Chicago Press, 1991.
- CAMPBELL JR., K. E. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin: COMMENT. **Geology Forum**, p. e212, 2010.
- CAMPBELL JR., K. E.; FRAILEY, C. D.; ROMERO PITTMAN, L. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. **Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology**, v. 239, p. 166-219, 2006.
- CAMPBELL JR., K. E. et al. Upper Cenozoic chronostratigraphy of the southwestern Amazon

Basin. **Geology**, v. 29, n. 7, p. 595–598, 2001.

CAPUTO, M. V. Solimões megashear: Intraplate tectonics in northwestern Brazil. **Geology**, v. 19, p. 246-249, 1991.

CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R. S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O., *et al* (Ed.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Brazil: EDIPUCRS, 2003. p.22-28.

CARVALHO, M. R.; MAISEY, J. G.; GRANDE, L. Freshwater stingrays of the Green River formation of Wyoming (early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 284, p. 1-136, 2004.

CARVALHO, M. R. D.; LOVEJOY, N. R. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Zootaxa**, v. 2776, p. 13-48, 2011.

CARVALHO, M. R. D.; MAISEY, J. G.; GRANDE, L. Freshwater stingrays of the Green River formation of Wyoming (early Eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 284, p. 1-136, 2004.

CARVALHO, M. R. D.; PEREZ, M. H. S.; LOVEJOY, N. R. *Potamotrygon tigrina*, a new species of freshwater stingray from the upper Amazon basin, closely related to *Potamotrygon schroederi* Fernandez-Yépez, 1958 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Zootaxa**, v. 2827, p. 1-30, 2011.

CARVALHO, M. R. D.; RAGNO, M. P. An unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. nov., from the upper and mid amazon basin: the second species of *Plesiotrygon* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Papéis Avulsos de Zoologia: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo**, v. 51, n. 7, p. 101-138,

2011.

CARVALHO, M. R. D.; SILVA, J. P. C. B. D. A taxonomic and morphological redescription of *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963 (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 209-232, 2011.

CHAN, K. M. A.; LEVIN, S. A. Leakey prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. **Evolution**, v. 59, n. 4, p. 720-729, 2005.

CHAN, K. M. A.; MOORE, B. R. Whole-Tree Methods for Detecting Differential Diversification Rates. **Systematic Biology**, v. 51, n. 6, p. 855-865, 2002.

COLLESS, D. H. Review of Phylogenetics: The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics. **Systematic Zoology**, v. 31, n. 1, p. 100-104, 1982.

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, n. 4, p. 335-347, 2001/9 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VDS-43TP7BS-1/2/3b9f59a7e3fc39231e5ed9dfdb2d91ab>>.

CURRAT, M. et al. The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. **Evolution**, v. 62, n. 8, p. 1908-1920, 2008.

DECELLES, P. G.; GILES, K. A. Foreland basin systems. **Basin Research** v. 8, p. 105-123, 1996.



DEGNAN, J. H.; SALTER, L. A. Gene tree distributions under the coalescent process. **Evolution**, v. 59, n. 1, p. 24-37, 2005.

DEYNAT, P. *Potamotrygon marinae* n. sp., une nouvelle espece de raies d'eau douce de Guyane (Myliobatiformes, Potamotrygonidae). **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, p. 483-493, 2006.

DOBSON, D. M.; DICKENS, G. R.; REA, D. K. Terrigenous sediment on Ceara Rise: a Cenozoic record of South American orogeny and erosion. **Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology**, v. 165, p. 215–229, 2001.

DRUMMOND, A. J. et al. Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. **PLoS Biology**, v. 4, n. 5, p. 699-710, 2006.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 214, p. 1-8, 2007.

DUNCAN, W. P. et al. Ionic regulation and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in gills and kidney of the freshwater stingray *Paratrygon aiereba* living in white and blackwaters in the Amazon Basin. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 956-960, 2009.

DUNN, K. A.; MCEACHRAN, J. D.; HONEYCUTT, R. L. Molecular phylogenetics of myliobatiform fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with comments on the effects of missing data on parsimony and likelihood. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, p. 259-270, 2003.

ECHAVARRIA, L. et al. Subandean thrust and fold belt of northwestern Argentina: Geometry and timing of the Andean evolution. **American Association of Petroleum Geologists Bulletin**, v. 87, n. 6, p. 965-985, 2003.

ESPURT, N. et al. The Nazca Ridge and uplift of the Fitzcarrald Arch: implications for regional geology in northern South America. In: HOORN, C. e WESSELINGH, F. P. (Ed.).

- Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past:** Wiley-Blackwell, 2010.
- ESPURT, N. et al. How does the Nazca Ridge subduction influence the modern Amazonian foreland basin? **Geology**, v. 35, n. 6, p. 515-518, 2007.
- EXCOFFIER, L. et al. Genetic consequences of range expansions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 40, p. 481-501, 2009.
- FARRIS, J. S. et al. Testing significance of incongruence. **Cladistics**, v. 10, p. 315-319, 1994.
- FRANZINELLI, E.; IGREJA, H. Modern sedimentation in the Lower Negro River, Amazonas State, Brazil. **Geomorphology**, v. 44, p. 259-271, 2002.
- FUNK, D. J.; OMLAND, K. E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 34, p. 397-423, 2003.
- GADAGKAR, S. R.; ROSENBERG, M. S.; KUMAR, S. Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 304, n. 1, p. 64-74, 2005. ISSN 1552-5015.
- GINGRAS, M. K.; RÄSÄNEN, M. E.; RANZI, A. The significance of bioturbated inclined heterolithic stratification in the southern part of the miocene Solimoes formation, Rio Acre, Amazonia Brazil. **Palaios**, v. 17, p. 591-601, 2002.
- HAMILTON, A. Phylogeny of *Limia* (Teleostei: Poeciliidae) based on NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, n. 2, p. 277-289, 2001.
- HAQ, B. U. Paleoceanography: a synoptic overview of 200 million years of ocean history. In:

HAQ, B. U. e MILLIMAN, J. D. (Ed.). **Marine geography and oceanography of Arabian Sea and coastal Pakistan**. New York, NY: Van Nostrand Reinhold, 1984. p.201-234.

HAQ, B. U.; HARDENBOL, J.; VAIL, P. R. Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. **Science**, v. 235, p. 1156-1166, 1987.

HARMON, L. J. et al. GEIGER: investigating evolutionary radiations. **Bioinformatics**, v. 24, n. 1, p. 129-131, 2008.

HARRIS, S. E.; MIX, A. C. Climate and tectonic influences on continental erosion of tropical South America, 0–13 Ma. **Geology**, v. 30, n. 5, p. 447–450, 2002.

HERDER, F. et al. Adaptive radiation and hybridization in Wallace's Dreamponds: evidence from sailfin silversides in the Malili Lakes of Sulawesi. **Proceedings of the Royal Society London Ser B**, v. 273, n. 1598, p. 2209-2217, 2006.

HEY, J. Isolation with migration models for more than two populations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 4, p. 905-920, 2010.

HIPP, A. L.; HALL, J. C.; SYTSMA, K. J. Congruence Versus Phylogenetic Accuracy: Revisiting the Incongruence Length Difference Test. **Systematic Biology**, v. 53, n. 1, p. 81-89, 2004.

HODGES, S. A.; ARNOLD, M. L. Columbines: a geographically widespread species flock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 11, p. 5129-5132, 1994.

HOLDER, M. T.; ANDESRON, J. A.; HOLLOWAY, A. K. Difficulties in detecting hybridization. **Systematic Biology**, v. 50, n. 6, p. 978-982, 2001.

HOORN, C. An environment reconstruction of the paleo-Amazon River system (middle-late Miocene, NW Amazonia). **Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology**, v. 112, p.

187238, 1994.

HOORN, C. et al. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. **Geology**, v. 23, n. 3, p. 237-240, March 1, 1995 1995. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1130/0091-7613\(1995\)023<0237:ATAACF>2.3.CO;2](http://dx.doi.org/10.1130/0091-7613(1995)023<0237:ATAACF>2.3.CO;2) >.

HOORN, C.; VONHOF, H. B. Neogene Amazonia: Introduction to the special issue. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 21, p. 1-4, 2006.

HOORN, C.; WESSELINGH, F. P. **Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past**. Wiley-Blackwell, 2010. 447.

HOORN, C. et al. The development of the Amazonian mega-wetland (Miocene; Brazil, Colombia, Peru, Bolivia). In: HOORN, C. e WESSELINGH, F. P. (Ed.). **Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past**. 1: Wiley-Blackwell, 2010. cap. 8, p.124-142.

HORTON, B. K.; DECELLES, P. G. The modern foreland basin system adjacent to the Central Andes. **Geology**, v. 25, n. 10, p. 895-898, 1997.

HOVIKOSKI, J. et al. The nature of Miocene Amazonian epicontinental embayment: High-frequency shifts of the low-gradient coastline. **Geological Society of America Bulletin**, v. 119, n. 11/12, p. 1506-1520, 2007.

HOVIKOSKI, J. et al. Miocene semidiurnal tidal rhythmites in Madre de Dios, Peru. **Geology**, v. 33, n. 3, p. 177-180, 2005.

HOVIKOSKI, J. et al. Marine influence in Amazonia: evidence from the geological record. In: HOORN, C. e WESSELINGH, F. P. (Ed.). **Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past**: Wiley-Blackwell, 2010. cap. 9, p.143-161.

HUBERT, N. et al. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna.

**Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2115-2136, 2007. ISSN 1365-294X. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03267.x> >.

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

HUDSON, R. R. Gene genealogies and the coalescent process. **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**, v. 7, p. 1-44, 1990.

\_\_\_\_\_. Gene genealogies and the coalescent process. **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**, v. 7, p. 1-44, 1991.

HUDSON, R. R.; COYNE, J. A. Mathematical consequences of the genealogical species concept. **Evolution**, v. 56, n. 8, p. 1557-1565, 2002.

HUDSON, R. R.; TURELLI, M. Stochasticity overrules the "three-times rule": genetic drift, genetic draft, and coalescence times for nuclear loci versus mitochondrial DNA. **Evolution**, v. 57, p. 182-190, 2003.

IRION, G.; JUNK, W. J.; DE MELO, J. A. S. N. The large central Amazonian river floodplains: geological, climatological, hydrological and geomorphological aspects. In: JUNK, W. J. (Ed.). **The central Amazon floodplain. Ecology of a pulsing system**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1997. p.23-46.

IRION, G.; KALLIOLA, R. J. Long-term landscape development processes in Amazonia. In: HOORN, C. e WESSELINGH, F. P. (Ed.). **Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past**: Wiley-Blackwell, 2010. p.185-197.

IRION, G. et al. Quaternary geology of the Amazonian Lowland. **Geo-Marine Letters**, v. 15, p. 172-178, 1995.

IRION, G.; RÄSÄNEN, M. D. Rossetti, P. Mann de Toledo, A.-M. Góes, New geological

framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. **Quaternary Research**, v. 64, p. 279-282, 2005.

JOB, G.; HAESELER, A. V.; STRIMMER, K. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, n. 18, p. 1-9, 2004.

KAANDORP, R. J. G.; WESSELINGH, F. P.; VONHOF, H. B. Ecological implications from geochemical records of Miocene Western Amazonian bivalves. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 21, p. 54-74, 2006.

KNOWLTON, N. et al. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. **Science**, v. 260, n. 5114, p. 1629-1632, 1993.

KOZAK, K. H.; WEISROCK, D. W.; LARSON, A. Rapid lineage accumulation in a non-adaptive radiation: phylogenetic analysis of diversification rates in eastern North American woodland salamanders (Plethodontidae: Plethodon). **Proceedings of the Royal Society B**, v. 273, p. 539-546, 2006.

LANDAU, B.; DA SILVA, C. M.; VERMEIJ, G. Pacific elements in the Caribbean Neogene gastropod fauna: the source-sink model, larval development, disappearance, and faunal units. **Bulletin de la Societe Geologique de France**, v. 180, n. 4, p. 343-352, 2009.

LATRUBESSE, E. M. et al. Late Miocene continental sedimentation in southwestern Amazonia and its regional significance: Biotic and geological evidence. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 23, p. 61-80, 2007.

LIMA, C. C. D. Ongoing compression across intraplate South America: observations and some implications for petroleum exploitation and exploration. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 30, n. 1, p. 203-207, 2000.

LINNEN, C. R.; FARRELL, B. D. MITONUCLEAR DISCORDANCE IS CAUSED BY

RAMPANT MITOCHONDRIAL INTROGRESSION IN NEODIPRION (HYMENOPTERA: DIPRIONIDAE) SAWFLIES. **Evolution**, v. 61, n. 6, p. 1417-1438, 2007.

LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic acids research**, v. 2, n. 3, p. 383-390, 1975. ISSN 0305-1048.

LOVEJOY, N. R. Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 117, p. 207-257, 1996.

LOVEJOY, N. R.; ALBERT, J. S.; CRAMPTON, W. G. R. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 21, n. 1-2, p. 5-13, 2006.

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 *Potamorrhaphis*. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 3, p. 259-268, 2000.

LUNDBERG, J. G. et al. The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E., et al (Ed.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Brazil: EDIPUCRS, 1998. p.13-48.

MADDISON, W. P. Gene trees in species trees. **Systematic Biology**, v. 46, n. 3, p. 523-536, 1997.

MALLET, J. Hybrid speciation. **Nature**, v. 444, p. 279-283, 2007.

MAPES, R. W. **Past and present provenance of the Amazon river**. 2009. 185 PhD (Doctor of Philosophy). Department of Geological Sciences, University of North Carolina at Chapel

Hill, Chapel Hill.

MCEACHRAN, J. D.; DUNN, K. A.; MIYAKE, T. Interrelationships within the batoid fishes (Chondrichthyes: Batoidea). In: STIASSNY, M. L. J.; PARENTI, L. R., *et al* (Ed.).

**Interrelationship of Fishes**. New York, NY: Academic Press, 1996. p.63-84.

MELICIANO, N. V. **Estudo filogeográfico do gênero *Pterophyllum*, Heckel, 1840 (Cichlidae / Heroini) na Bacia Amazônica, utilizando o gene do citocromo b e morfometria geométrica**. 2008. 112 (MSc.). GCBEV, INPA/UFAM, Manaus.

MELO-FERREIRA, J. *et al*. Recurrent introgression of mitochondrial DNA among hares (*Lepus* spp.) revealed by species-tree inference and coalescent simulations. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 367-381, 2012.

MOLNAR, P. Closing of the Central American Seaway and the Ice Age: A critical review. **Paleoceanography**, v. 23, p. 1-15, 2008.

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, n. 7, p. 1855-1867, 2003.

MOOERS, A. O.; HEARD, S. B. Inferring evolutionary process from phylogenetic tree shape. **The Quarterly Review of Biology**, v. 72, n. 1, p. 31-54, 1997.

MOORE, B. R.; CHAN, K. M. A.; DONOGHUE, M. J. Detecting diversification rate variation in supertrees. In: BININDA-EMONDS, O. R. P. (Ed.). **Phylogenetic Supertrees: Combining Information to Reveal the Tree of Life**. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 2004. cap. 22, p.487-533.

MOORE, W. S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. **Evolution**, v. 49, n. 4, p. 718-726, 1995.



MORA, A. et al. Tectonic history of the Andes and sub-Andean zones: implications for the development of the Amazon drainage basin. In: HOORN, C. e WESSELINGH, F. P. (Ed.). **Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past**. 1: Wiley-Blackwell, 2010. cap. 4, p.38-60.

NEE, S. et al. Extinction rates can be estimated from molecular phylogenies. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 344, p. 77-82, 1994.

NEE, S.; MOOERS, A. O.; HARVEY, P. H. Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 8322-8326, 1992.

NETO, D. G. et al. Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2007.

NIELSEN, R.; WAKELEY, J. Distinguishing migration from isolation: A Markov Chain Monte Carlo approach. **Genetics**, v. 158, n. 2, p. 885-896, June 1, 2001 2001. Disponível em: < <http://www.genetics.org/cgi/content/abstract/158/2/885> >.

NISHIDA, K. Phylogeny of the suborder Myliobatidoidei. **Memoires of the Faculty of Fisheries Hokkaido University**, v. 37, n. 1/2, p. 1-108, 1990.

NORDBORG, M. Coalescent theory. In: BALDING, D. J.; BISHOP, M., et al (Ed.). **Handbook of Statistical Genetics**. New York, NY: John Wiley & Sons, 2001. p.179-212.

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

\_\_\_\_\_. 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.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. **Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University, 2004.**

ONCKEN, O. et al. Deformation of the Central Andean Upper Plate System – Facts, Fiction, and Constraints for Plateau Models. In: ONCKEN, O.; CHONG, G., *et al* (Ed.). **The Andes: Active Subduction Orogeny**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. p.3-27.

PAMILO, P.; NEI, M. Relationships between gene trees and species trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 5, p. 568-583, 1988.

PARADIS, E.; CLAUDE, J.; STRIMMER, K. APE: analyses of Phylogenetics and evolution in R language. **Bioinformatics**, v. 20, n. 2, p. 289-290, 2004.

POE, S.; CHUBB, A. L. Birds in a bush: five genes indicate explosive evolution of avian orders. **Evolution**, v. 58, n. 2, p. 404-415, 2004.

PURVIS, A.; NEE, S.; HARVEY, P. H. Macroevolutionary inferences from primate phylogeny. **Proceedings of the Royal Society London Ser B**, v. 260, p. 329-333, 1995.

PYBUS, O. G.; HARVEY, P. H. Testing macro-evolutionary models using incomplete molecular phylogenies. **Proceedings of the Royal Society of London, B**, v. 267, p. 2267-2272, 2000.

RABOSKY, D. L. LIKELIHOOD METHODS FOR DETECTING TEMPORAL SHIFTS IN DIVERSIFICATION RATES. **Evolution**, v. 60, n. 6, p. 1152–1164, 2006.

RÄSÄNEN, M. E. et al. Late Miocene tidal deposit in the Amazonia foreland basin. **Science**, v. 269, p. 386-390, 1995.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J., Eds. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Brazil: EDIPUCRS, p.734ed. 2003.

RIESEBERG, L. H. Hybrid origins of plant species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 28, p. 359-389, 1997.

RIESEBERG, L. H.; ARCHER, M. A.; WAYNE, R. K. Transgressive segregation, adaptation and speciation. **Heredity**, v. 83, p. 363-372, 1999.

RINCON, G. F. **Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau) (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no rio Paranã-Tocantins**. 2006. 132 Ph.D. Biology, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro, Brazil.

RODDAZ, M. et al. Forebulge dynamics and environmental control in Western Amazonia: The case study of the Arch of Iquitos (Peru). **Tectonophysics**, v. 399, p. 87–108, 2005.

RODDAZ, M. et al. Miocene tidal-influenced sedimentation to continental Pliocene sedimentation in the forebulge–backbulge depozones of the Beni–Mamore foreland Basin (northern Bolivia). **Journal of South American Earth Sciences**, v. 20, p. 351-368, 2006.

RODDAZ, M. et al. Cenozoic sedimentary evolution of the Amazonian foreland basin system. In: HOORN, C. e WESSELINGH, F. P. (Ed.). **Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past**. 1: Wiley-Blackwell, 2010. cap. 5, p.61-88.

RODDAZ, M. et al. Sediment provenances and drainage evolution of the Neogene Amazonian foreland basin. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 239, p. 57-78, 2005.

ROSA, R. S. **A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)**. 1985. 523 Ph.D. Faculty of the School of Marine Sciences, The College of William and Mary, Williamsburg, VA.

ROSA, R. S.; CARVALHO, M. R. D.; WANDERLEY, C. D. A. *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of Neotropical freshwater stingray from Surinam. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2008.

ROSSETTI, D. D. F. Delineating shallow Neogene deformation structures in northeastern Pará State using Ground Penetrating Radar. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 2, p. 235-248, 2003.

\_\_\_\_\_. Paleosurfaces from northeastern Amazonia as a key for reconstructing paleolandscapes and understanding weathering products. **Sedimentary Geology**, v. 169, p. 151-174, 2004.

ROSSETTI, D. D. F.; TOLEDO, P. M. D.; GÓES, A. M. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. **Quaternary Research**, n. 63, p. 78-89, 2005.

ROSSETTI, D. 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.

SAITOU, N.; NEI, M. The number of nucleotides required to determine the branching order of three species, with special reference to the human-chimpanzee-gorilla divergence **Journal of Molecular Evolution**, v. 24, p. 189-204, 1986.

SANDERSON, M. J. r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. **Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p. 301-302, 2002.

SATO, A. et al. Phylogeny of Darwin's finches as revealed by mtDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 9, p. 5101-5106, 1999.

SCHLUTER, D. **The Ecology of Adaptive Radiation**. Oxford, England: Oxford University Press, 2000. 288.

SEEHAUSEN, O. Hybridization and adaptive radiation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 4, p. 198-207, 2004.

SEMPERE, T.; FOLGUERA, A.; GERBAULT, M. New insights into Andean evolution: An introduction to contributions from the 6th ISAG symposium (Barcelona, 2005).

**Tectonophysics**, n. 459, p. 1-13, 2008.

SHAO, K.-T. Tree balance. **Systematic Biology**, v. 39, n. 3, p. 266-276, 1990.

SHAW, K. L. Sequential radiations and patterns of speciation in the Hawaiian cricket genus *Laupala* inferred from DNA sequences. **Evolution**, v. 50, n. 1, p. 237-255, 1996.

SHAW, K. L. Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: What mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets.

**Evolution**, v. 99, n. 25, p. 16122-16127, 2002.

SHIBUYA, A.; ARAÚJO, M. L. G.; ZUANON, J. A. S. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii, Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 4, p. 466-475, 2009.

SHIMODAIRA, H. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. **Systematic Biology**, v. 51, n. 3, p. 492-508, 2002.

SHIMODAIRA, H.; HASEGAWA, M. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 8, p. 1114-1116, August 1, 1999 1999. Disponível em: < <http://www.molbioevol.org> >.

SHIMODAIRA, H.; HASEGAWA, M. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1246-1247, 2000.

SILVA, J. P. C. B. D.; CARVALHO, M. R. D. A new species of neotropical freshwater stingray of the genus *Potamotrygon* Garman, 1877 from the Río Madre de Díos, Peru (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Papéis Avulsos de Zoologia: Museu de Zoologia da**

**Universidade de São Paulo**, v. 51, n. 8, p. 139-154, 2011.

SIOLI, H., Ed. **The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin**. Monographiae Biologicae. New York, NY: Springer Verlag, v.56, p.800, Monographiae Biologicae. 1984.

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

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 3rd edition. New York: W. H. Freeman and Co., 1995.

SOTA, T.; VOGLER, A. P. Incongruence of Mitochondrial and Nuclear Gene Trees in the Carabid Beetles Ohomopterus. **Systematic Biology**, v. 50, n. 1, p. 39-59, 2001.

SOUZA, E. R. D. **Filogeografia do gênero Neotropical *Fluviophylax* (CYPRINODONTIFORMES: POECILIIDAE) das Bacias do Amazonas e Orinoco**. 2008. 123 (MSc.). GCBEV, INPA/UFAM, Manaus.

STADLER, T. **TreeSim: Simulating trees under the birth-death mode**: Available at: <http://cran.r-project.org/web/packages/TreeSim/index.html> p. 2012.

TAJIMA, F. Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, v. 105, p. 437-460, 1983.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1996.

TOEWS, D. P. L.; BRELSFORD, A. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 3907-3930, 2012.

TOFFOLI, D. et al. A test of the utility of 'barcoding' in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae: Rajiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 324-336, 2008.

UBA, C. E.; HEUBECK, C.; HULKA, C. Evolution of the late Cenozoic Chaco foreland basin, Southern Bolivia. **Basin Research**, v. 18 p. 145-170, 2006.

WEISROCK, D. W. et al. Multiple nuclear gene sequences identify phylogenetic species boundaries in the rapidly radiating clade of Mexican ambystomatid salamanders. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 2489-2503, 2006. Disponível em: < <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1095-8312.2006.00655.x> >.

WESSELINGH, F. P. Miocene long-lived lake Pebas as a stage of mollusc radiations, with implications for landscape evolution in western Amazonia. **Scripta Geologica**, v. 133, n. 2006, p. 1-17, 2006.

WESSELINGH, F. P. et al. The stratigraphy and regional structure of Miocene deposits in western Amazonia (Peru, Colombia and Brazil), with implications for late Neogene landscape evolution. **Scripta Geologica**, v. 133, p. 291-322, 2006.

WESSELINGH, F. P. et al. On the origin of Amazonian landscapes and biodiversity: a synthesis. In: HOORN, C. e WESSELINGH, F. P. (Ed.). **Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past**: Wiley-Blackwell, 2010. cap. 26, p.421-431.

WESSELINGH, F. P. et al. Lake Pebas: a palaeoecological reconstruction of a Miocene, long-lived lake complex in western Amazonia. **Cainozoic Research**, v. 1, n. 1-2, p. 35-81, 2002.

WILKINSON, M. J. et al. Megafan environments in northern South America and their impact on Amazon Neogene aquatic ecosystems. In: HOORN, C. e WESSELINGH, F. P. (Ed.).

**Amazonia: landscape and species evolution: a look into the past:** Wiley-Blackwell, 2010.  
cap. 10, p.162-184.

WON, Y.-J.; HEY, J. Divergence population genetics of Chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 2, p. 297-307, 2005.

WOOD, C. M. et al. Mechanisms of ion transport in Potamotrygon, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 3039-3054, 2002.

ZHANG, D.-X.; HEWITT, G. M. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 247-251, 1996.

ZOBACK, M. L. et al. Global patterns of tectonic stress. **Nature**, v. 341, p. 291-298, 1989.

ZWICKL, D. J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion.** 2006. The University of Texas at Austin