

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

NIVALDO MAGALHÃES PIORSKI

Diversidade Genética e Filogeografia das Espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil

**SÃO CARLOS
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

NIVALDO MAGALHÃES PIORSKI

Diversidade Genética e Filogeografia das Espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução 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.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

**SÃO CARLOS
2010**

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

P662dg

Piorski, Nivaldo Magalhães.

Diversidade genética e filogeografia das espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil / Nivaldo Magalhães Piorski. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
152 f.

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

1. Genética de populações. 2. Região neotropical. 3. Peixe de água doce. 4. Variabilidade genética. 5. Áreas de endemismo. I. Título.

CDD: 575.15 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E FILOGEOGRAFIA DAS ESPÉCIES HOPLIAS
MALABARICUS (BLOCH, 1794) E PROCHILODUS LACUSTRIS
STEINDACHNER, 1907 NO NORDESTE DO BRASIL.**

Tese de Doutorado de Nivaldo Magalhães Piorski

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta

Profa. Dra. Alexandra Sanches


.....
.....
.....
.....
.....

*Para Giselle, Caroline
e Gabriel, fonte de
vida, alegria e amor
eternos*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de energia, pelo dom que me deu de conseguir *não entrar em parafuso* quando isso parece iminente.

À minha esposa e aos meus filhos, não só agradeço por vocês existirem e serem parte de mim, mas também peço desculpas pela ausência nas horas em que, embora de corpo presente, a cabeça estava longe. Gisa, tu estavas certa, eu não poderia desistir.

Obrigado Prof. Dr. Pedro M. Galetti Jr. pela oportunidade de ser seu orientando e de poder realizar parte desse trabalho em seu laboratório.

Agradeço à banca examinadora pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento destes trabalho.

Os professores Dr. Antonio Carlos Leal de Castro e Dr. José Policarpo Costa Neto, amigos e colegas de trabalho, foram fundamentais com o apoio e incentivos constantes, principalmente nos momentos críticos em que foram necessárias as suas experiências com a burocracia universitária.

O Prof. Dr. Jorge Luiz S. Nunes, amigo e parceiro, foi um dos principais responsáveis pelo meu ingresso no doutorado. Um poço de idéias e sempre de bom astral. Obrigado companheiro pela sua amizade.

Outro responsável por essa “aventura” foi o Prof. Dr. Luiz Fernando Carvalho Costa. Obrigatoriamente intitulado *co-orientador*, pois sem a sua participação e disposição para ensinar a saída do labirinto molecular, essa tese teria sido mais complicada.

Serei eternamente grato à Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira que me recebeu de braços abertos em seu laboratório, onde boa parte do trabalho se desenvolveu. Sem a sua colaboração, teria sido impossível continuar o trabalho em São Luís.

Agradeço aos amigos da UFSCar, em especial, ao Mauricio C. Avila e Ana Karina (e de tabela ao Paulão) por me darem permissão de encher os ouvidos deles com

conversas saudosas da minha casa. O Mauricio me acolheu em sua casa durante um dos períodos mais complicados dessa jornada e a Ana Karina, com o seu conhecimento, deu boas dicas dentro do laboratório.

Daniel Toffoli foi uma daquelas pessoas em que um breve encontro, vale por várias horas de conversa. As suas dicas de ArcGis e as breves discussões sobre a variação no nível do mar foram muito importantes.

Sou grato ao professor Dr. Oliver Kuppinger pela sua disponibilidade em ler e corrigir de muita boa vontade o abstract desse trabalho.

A Profa. Dra. Silvia Helena de Sousa Arcanjo esclareceu dúvidas e pacientemente leu a seção com informações geológicas.

Agradeço ao amigo José de Ribamar Lima Alves, *in memoriam*, pela alegria com que se dispôs na coleta e envio de material do trecho baixo do rio Itapecuru.

Por fim, agradeço ao PPG de Genética e Evolução da UFSCar pelos excelentes professores, com os quais tive a oportunidade de aprender novos conhecimentos; à CAPES – UFMA pela concessão da bolsa PICDT; ao Banco da Amazônia S/A pelo financiamento concedido através do Contrato/Convênio 265/2006 BASA-UFMA.

“... a vida podia ser apenas estar sentado na erva, segurar um malmequer e não lhe arrancar as pétalas, por serem já sabidas as respostas, ou por serem estas de tão pouca importância, que descobri-las não valeria a vida duma flor.”

José Saramago, *Memorial do Convento*, p. 263.

RESUMO

O Estado do Maranhão é geralmente considerado uma área de transição entre o semiárido nordestino e a floresta amazônica, onde está localizado um conjunto de rios perenes, tais como, Parnaíba, Itapecuru, Mearim, Pindaré e Gurupi. Análises baseadas em padrões de distribuição têm indicado que a região constitui uma área de endemismo para peixes neotropicais. No entanto, devido ao reduzido número de estudos, as interrelações desse conjunto hidrográfico com áreas vizinhas são pouco compreendidas. Uma das dificuldades que surge do esqualido conhecimento científico é a identificação do nível de endemismo que a região abriga, uma vez que há problemas na definição dos limites taxonômicos de várias espécies com ocorrência registrada na área. Assim, este trabalho teve como objetivo testar as hipóteses de que as espécies de peixes dos rios do Maranhão são unidades taxonômicas válidas e, conseqüentemente, o conjunto hidrográfico pode ser considerado uma área de endemismo. O estudo foi centrado na análise de diversidade genética das espécies *Hoplias malabaricus* e *Prochilodus lacustris*. Em *H. malabaricus* a variação geográfica foi estudada usando sequências da região controle do DNAm e através de morfometria geométrica. Além do marcador mitocondrial, na análise da variação em *P. lacustris* foram utilizadas sequências do íntron 1 do gene S7. Ambas as espécies apresentaram alta variabilidade genética que parece estar associada às características ecológicas de cada uma. *H. malabaricus*, sendo sedentária, teve sua diversidade genética influenciada por arquitetura de drenagem. Por outro lado, dado o comportamento migratório de *P. lacustris*, os resultados sugeriram que a variabilidade observada foi influenciada por fatores históricos. A maior resolução dos dados em *P. lacustris* permitiu testar a hipótese de relógio molecular e estimar tempos de divergências entre as populações amostradas. Estas estimativas foram combinadas com informações geológicas disponíveis, possibilitando a identificação de vários eventos que provavelmente exerceram papéis importantes na diferenciação da ictiofauna maranhense. Do

ponto de vista taxonômico, as análises reforçaram a hipótese de que *H. malabaricus* é um complexo de espécie, sugerindo a possibilidade de ocorrência de espécies crípticas na área. As amostras de *P. lacustris*, por sua vez, constituem uma unidade taxonômica, mas não são consistentes com a hipótese de que a espécie é endêmica para os rios Parnaíba e Mearim. Diante dos resultados obtidos, sugerimos que a indicação mais aproximada de áreas de endemismo seja a de ecorregiões definidas pela Secretaria de Recursos Hídricos do Ministério do Meio Ambiente.

Palavras-Chave: Região neotropical. Nordeste do Brasil. Peixes de água doce. Diversidade genética. Filogeografia. Áreas de endemismo. Relógio molecular. Morfometria geométrica.

ABSTRACT

Genetic diversity and phylogeography of the species *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) and *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 in northeastern Brazil

The State of Maranhão is considered as a transitional area between northeastern semiarid and amazonian rainforest. Various perennial rivers such as the rivers Parnaíba, Itapecuru, Mearim, Pindaré and Gurupi are found in Maranhão. Distribution patterns analysis indicated the region as an endemism area for Neotropical freshwater fishes. However, only few studies have been performed in the region. Therefore the relationships between the hidrographic set and the respective neighbour areas are not fully comprehended. One complication is the insufficient scientific knowledge about the endemism level in the region due to insufficient establishment of taxonomic bounds for several species in the area. This study examines the hypothesis that freshwater fishes from Maranhão rivers are valid taxonomic unities, and whether its hydrographic set can be considered as an endemism area for Neotropical fishes. The study is focused on the analsis of genetic differentiation of *Hoplias malabaricus* and *Prochilodus lacustris*. The geographic variation of *H. malabaricus* was studied using sequences of the DNAm control region as well by geometric morphometrics. Besides the mitochondrial marker, the variation analyses of *P. lacustris* employed sequences of the S7 intron 1. Both species exhibited high genetic variability which may be related to its own ecological features. The genetic diversity of *H. malabaricus*, a sedentary species, is influenced by drainage architerture. On the other hand, the migratory behavior of *P. lacustris* and the results obtained had suggested that the variability found was influenced by historical factors. Because the most resolution of the *P. lacustris* data, the molecular clock hypothesis was tested and divergence times between populations sampled were estimated. These estimates matching with geological informations enabled us to identify several putative events that may play an important role in differentiation of the maranhense ichthyofauna. Under the taxonomic point of view, the

hypothesis that *H. malabaricus* is a species complex was reinforced and the analyses suggested that putative cryptic species occur in the region. The *P. lacustris* specimens constitute a taxonomic unit, but did not support the hypothesis that the species is endemic for the Parnaíba and Mearim rivers. Considering these results, we suggest that the most closely indication of endemism areas could be the ecoregions established by Secretaria de Recursos Hídricos from Ministério do Meio Ambiente.

Key-words: Neotropical region. Brazil northeastern. Freshwater fishes. Genetic diversity. Phylogeography. Endemism areas. Molecular clock. Geometric morphometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1. Áreas de endemismo para peixes neotropicais propostas por Gery (1969).....	28
Figura 2-2. Áreas de endemismo para a família Curimatidae propostas por Vari (1988).....	29
Figura 2-3. Áreas de endemismo para peixes neotropicais de acordo com Lundberg <i>et al.</i> (1998).	31
Figura 2-4. Áreas de endemismo para a região neotropical propostas por Hubert & Renno (2006) com base na distribuição de peixes da ordem Characiformes.....	32
Figura 2-5. Ecorregiões aquáticas do Brasil definidas pela SRH/MMA (2005).....	34
Figura 2-6. Domínios geoambientais e regiões ecológicas do Estado do Maranhão. Modificado de Feitosa & Trovão (2006).....	36
Figura 2-7. Limites da Região Hidrográfica Tocantins-Araguaia. Modificado de MMA (2006b).....	38
Figura 2-8. Limites da Região Hidrográfica Atlântico Nordeste Ocidental. Modificado de MMA (2006c).....	39
Figura 2-9. Limites da Região Hidrográfica do Parnaíba. Modificado de MMA (2006d).	44
Figura 2-10. Províncias estruturais do Brasil. Fonte: Bizzi <i>et al.</i> (2003).....	46
Figura 2-11. Bacias sedimentares da Província Parnaíba. Fonte: Silva <i>et al.</i> (2003).	49
Figura 2-12. Provável distribuição da linha de costa durante o Mioceno nas regiões hidrográficas Tocantins, Nordeste Ocidental e Parnaíba.	57
Figura 2-13. Provável distribuição da linha de costa durante o Plioceno nas regiões hidrográficas Tocantins, Nordeste Ocidental e Parnaíba.	59
Figura 2-14. Provável distribuição da linha de costa durante o Pleistoceno nas regiões hidrográficas Tocantins, Nordeste Ocidental e Parnaíba.	60
Figura 2-15. Provável distribuição da linha de costa durante o Holoceno nas regiões hidrográficas Tocantins, Nordeste Ocidental e Parnaíba.	62
Figura 3-1. Locais de amostragem de tecidos nas regiões hidrográficas do Tocantins, Parnaíba e Atlântico Nordeste Ocidental.	65
Figura 3-2. Marcos anatômicos definidos sobre o corpo de <i>Hoplias malabaricus</i> . Veja texto para descrição dos pontos.	68
Figura 3-3. Rede de haplótipos das populações de <i>Hoplias malabaricus</i> , gerada pelo método de Parcimônia Estatística aplicado sobre um conjunto de sequências da região controle do DNAm.	71
Figura 3-4. Árvore haplotípica obtida pelos métodos Agrupamento de Vizinhos e Máxima Verossimilhança. Apenas valores de bootstrap maiores do que 50% são mostrados sobre os ramos.	72
Figura 3-5. Rede de máxima parcimônia para os haplótipos de <i>Hoplias malabaricus</i> , obtidos com base em sequências da região controle do DNAm, e a configuração utilizada para a análise dos cladogramas aninhados (NCA). Cada linha na rede representa uma mudança em um passo mutacional. Um círculo indica um nodo interno que não estava presente na amostra.	73
Figura 3-6. Ordenação das amostras de <i>Hoplias malabaricus</i> no espaço morfométrico das duas primeiras variáveis canônicas. À esquerda e abaixo do gráfico são mostradas as mudanças estimadas na forma do corpo associadas com cada eixo	

canônico. Números nas grades de deformação referem-se aos marcos anatômicos definidos sobre o corpo do animal.....	75
Figura 3-7. Ordenação das amostras de <i>Hoplias malabaricus</i> no espaço morfométrico da primeira e terceira variáveis canônicas. À esquerda do gráfico é mostrada a mudança estimada na forma do corpo associada com o terceiro eixo canônico. Números na grade de deformação referem-se aos marcos anatômicos definidos sobre o corpo do animal.....	76
Figura 4-1. Nível de saturação das transições e transversões no conjunto de dados da região controle do DNAm, avaliado pela distância Tamura-Nei (1993).....	96
Figura 4-2. Distribuição mismatch com base em sequências da região controle do DNAm para: a) uma população com todas as amostras, b) Parnaíba e c) Pindaré.....	98
Figura 4-3. Árvore haplotípica de <i>Prochilodus lacustris</i> , gerada pelo método de Máxima Verossimilhança aplicado sobre um conjunto de sequências da região controle do DNAm. B = baixo; M = médio, em referência aos diferentes trechos dos rios.....	101
Figura 4-4. Árvore haplotípica de <i>Prochilodus lacustris</i> , gerada pelo método de Agrupamento de Vizinhos aplicado sobre um conjunto de sequências da região controle do DNAm. B = baixo; M = médio, em referência aos diferentes trechos dos rios.....	102
Figura 4-5. Rede de haplótipos das populações de <i>Prochilodus lacustris</i> , gerada pelo método de Parcimônia Estatística aplicado sobre um conjunto de sequências da região controle do DNAm. A = alto; B = baixo; M = médio, em referência aos diferentes trechos dos rios.....	104
Figura 4-6. Rede de máxima parcimônia para os haplótipos de <i>P. lacustris</i> , obtidos com base em sequências da região controle do DNAm, e a configuração utilizada para a análise dos cladogramas aninhados (NCA). Cada linha na rede representa uma mudança em um passo mutacional. Um círculo indica um nodo interno que não estava presente na amostra.....	106
Figura 4-7. Árvore linearizada indicando os tempos de divergências, descritos no texto, das sequências da região controle do DNAm de <i>P. lacustris</i>	110
Figura 4-8. Nível de saturação das transições e transversões no conjunto de dados do íntron 1 do gene <i>S7</i> , avaliado pela distância Tamura-Nei (1993).....	111
Figura 4-9. Distribuição mismatch com base em sequências do íntron <i>S7</i> para: a) uma população com todas as amostras, b) Parnaíba e c) Pindaré.....	113
Figura 4-10. Árvore haplotípica de <i>Prochilodus lacustris</i> , gerada pelo método de Máxima Verossimilhança aplicado sobre um conjunto de sequências do íntron <i>S7</i>	115
Figura 4-11. Árvore haplotípica de <i>Prochilodus lacustris</i> , gerada pelo método de Agrupamento de Vizinhos (NJ) aplicado sobre um conjunto de sequências do íntron <i>S7</i>	116
Figura 4-12. Rede de haplótipos das populações de <i>Prochilodus lacustris</i> , gerada pelo método de Parcimônia Estatística aplicado sobre um conjunto de sequências do íntron <i>S7</i> . A = alto; B = baixo; M = médio, em referência aos diferentes trechos dos rios.....	117
Figura 4-13. Rede de máxima parcimônia para os haplótipos de <i>P. lacustris</i> , obtidos com base em sequências do íntron <i>S7</i> , e a configuração utilizada para a análise dos cladogramas aninhados (NCA). Cada linha na rede representa uma mudança em um passo mutacional. Um círculo indica um nodo interno que não estava presente na amostra.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1. Características moleculares das populações de <i>Hoplias malabaricus</i>	70
Tabela 3-2. Divergência genética par a par entre as populações de <i>Hoplias malabaricus</i> com base em sequências da região controle do DNAm. Valores acima da diagonal são diferenças entre grupos. Valores na diagonal são diferenças dentro dos grupos.	70
Tabela 3-3. Clados com associação geográfica significativa produzidos pela NCA para as sequências do DNAm de <i>Hoplias malabaricus</i>	73
Tabela 3-4. Resultados da AMOVA para as populações de <i>Hoplias malabaricus</i> . Va = variação entre populações; Vb = variação intra-populações.	74
Tabela 3-5. Resultado da AMOVA para comparação dos clados H1 e H11. Va = variação entre populações; Vb = variação intra-populações.....	74
Tabela 4-1. Número de indivíduos de <i>P. lacustris</i> obtidos nos locais de coleta.	91
Tabela 4-2. Características moleculares de <i>Prochilodus lacustris</i> com base em sequências da região controle do DNAm.	97
Tabela 4-3. Divergência genética par a par entre as populações de <i>Prochilodus lacustris</i> com base em sequências da região controle do DNAm. Valores abaixo da diagonal são diferenças entre grupos. Valores na diagonal são diferenças dentro dos grupos.	98
Tabela 4-4. Resultados da AMOVA para as populações de <i>Prochilodus lacustris</i> , com base nas sequências da região controle do DNAm. Va = variação entre populações; Vb = variação dentro de populações.	99
Tabela 4-5. Comparação par a par dos valores de Φ_{ST} (abaixo da diagonal) e Nfm (acima da diagonal) entre as localidades amostradas de <i>P. lacustris</i> , com base nas sequências da região controle do DNAm.	99
Tabela 4-6. Clados com associação geográfica significativa detectados pela análise dos clados aninhados (NCA) sobre as sequências da região controle do DNAm de <i>P. lacustris</i> . A = alto, B = baixo e M = médio, em referência aos trechos dos rios.	105
Tabela 4-7. Resultados do teste RRT para avaliação da homogeneidade das taxas de substituição entre os clados Mearim, Tocantins e Parnaíba.	107
Tabela 4-8. Tempos de divergência (anos) das sequências da região controle do DNAm de <i>P. lacustris</i> , estimados através de análise Bayesiana usando coalescência sem especificar ponto de calibração na árvore.	108
Tabela 4-9. Tempos de divergência (anos) das sequências da região controle do DNAm de <i>P. lacustris</i> , estimados através de análise Bayesiana usando <i>soft bounds</i>	109
Tabela 4-10. Características moleculares de <i>Prochilodus lacustris</i> com base em sequências do íntron 1 do gene S7.....	112
Tabela 4-11. Divergência genética par a par entre as populações de <i>Prochilodus lacustris</i> com base em sequências do íntron S7. Valores abaixo da diagonal são diferenças entre grupos. Valores na diagonal são diferenças dentro dos grupos.	113
Tabela 4-12. Resultados da AMOVA para as populações de <i>Prochilodus lacustris</i> , com base nas sequências do íntron S7. Va = variação entre populações; Vb = variação dentro de populações.	114

Tabela 4-13. Comparação par a par dos valores de Φ_{ST} (abaixo da diagonal) e Nfm (acima da diagonal) entre as localidades amostradas de <i>P. lacustris</i> , com base nas sequências do íntron S7.....	114
--	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2	HISTÓRIA GEOMORFOLÓGICA DOS RIOS DO ESTADO DO MARANHÃO.....	22
2.1	<i>Hipóteses sobre a diversificação de vertebrados na América do Sul</i>	22
2.2	<i>Áreas de endemismo para peixes de água doce na região Neotropical</i>	27
2.3	<i>Características da Paisagem</i>	34
2.3.1	Relevo	34
2.3.2	Características hidrográficas da área de estudo	37
2.3.2.1	Região Hidrográfica Tocantins-Araguaia	37
2.3.2.2	Região Hidrográfica Atlântico Nordeste Ocidental.....	39
2.3.2.3	Região Hidrográfica do Parnaíba	43
2.4	<i>História geológica</i>	45
2.4.1	Bacias sedimentares.....	45
2.4.2	Evolução das drenagens.....	49
2.5	<i>Variações no nível do mar e mudanças climáticas</i>	54
3	VARIAÇÃO GEOGRÁFICA EM <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> (BLOCH, 1794) (CHARACIFORMES: ERYTHRINIDAE) DO NORDESTE DO BRASIL	63
3.1	<i>Introdução</i>	63
3.2	<i>Material e métodos</i>	65
3.2.1	Análise genética	65
3.2.2	Análise morfométrica	67
3.3	<i>Resultados</i>	69
3.3.1	Varição genética.....	69
3.3.2	Varição morfométrica.....	74
3.4	<i>Discussão</i>	77
3.4.1	Varição genética.....	77
3.4.2	Análise combinada das informações genéticas e morfométricas.....	82
3.4.3	Consequências para a taxonomia	86
4	DIVERSIDADE E FILOGEOGRAFIA DE <i>PROCHILODUS LACUSTRIS</i> STEINDACHNER 1907 (CHARACIFORMES: PROCHILODONTIDAE) NO NORDESTE DO BRASIL.....	88
4.1	<i>Introdução</i>	88
4.2	<i>Material e métodos</i>	91
4.2.1	Diversidade genética	91
4.2.2	Relações haplotípicas.....	93

4.3 Resultados	95
4.3.1 Região controle do DNA mitocondrial	95
4.3.1.1 Variação genética	95
4.3.1.2 Padrões de relações entre os haplótipos.....	100
4.3.1.3 NCA.....	103
4.3.1.4 Relógio molecular	107
4.3.2 Íntron 1 do gene S7	110
4.3.2.1 Variação genética	110
4.3.2.2 Padrões de relações entre os haplótipos.....	115
4.3.2.3 NCA.....	116
4.4 Discussão	118
4.4.1 Diversidade genética e consequências taxonômicas.....	118
4.4.2 Filogeografia de <i>P. lacustris</i>	122
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	130
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Biogeografia lida com a distribuição dos seres vivos. De forma mais restrita, esta ciência envolve a análise e explicação de padrões de distribuição, bem como o entendimento de mudanças atuais e passadas sobre a distribuição dos organismos (COX & MOORE, 1993; BERMINGHAN & MARTIN, 1998). Ball (1976) reconheceu três fases no desenvolvimento da Biogeografia: a fase descritiva ou empírica, uma fase narrativa e uma fase analítica, sendo que as duas últimas compreendem a Biogeografia Histórica. De acordo com o autor, é a biogeografia histórica que, através de seu método analítico, combinando hipóteses filogenéticas e padrões conhecidos de distribuição, permite a elaboração de teorias que esclarecem os padrões históricos da ocorrência de grupos em determinadas áreas. Tais padrões de distribuição são, muitas vezes, resultados de ação sinérgica de movimentos migratórios e história geológica da região (PFRENDER *et al.*, 2004), sendo que a compreensão da interação destes fatores durante a história evolutiva de um grupo de organismos tem sido o principal objeto de estudo durante muito tempo.

Estudos biogeográficos podem estar centrados no esclarecimento dos padrões de diferenciação das populações na área de distribuição de uma espécie (KETMAIER *et al.* 2003; SANJUR *et al.*, 2003) ou podem ser mais abrangentes envolvendo categorias taxonômicas amplas, revelando os padrões de origem e diversificação dos grupos envolvidos (DIOGO, 2004; BRIGGS, 2005), associados à história geológica da área.

De modo geral, estudos biogeográficos envolvendo níveis taxonômicos acima de espécie têm sido realizados através da aplicação do método filogenético sobre caracteres morfológicos (BUCKUP, 1993; LOVEJOY, 1996; LUCINDA *et al.*, 2005), ao passo que a nível infraespecífico têm sido utilizados dados moleculares (NEAR *et al.*, 2003; BANFORD *et al.*, 2004; FROUFE *et al.*, 2005). A incorporação de dados moleculares na inferência de padrões biogeográficos constitui uma disciplina denominada Filogeografia. Este termo,

cunhado por Avise *et al.* (1987), corresponde a um campo de estudo onde a biogeografia histórica e a genética de populações são integradas a fim de explicar os padrões observados na distribuição geográfica de linhagens genealógicas (AVISE, 1998; BERMINGHAM & MORITZ, 1998).

Estudos filogeográficos são baseados principalmente nas seqüências nucleotídicas de DNA mitocondrial (DNAMt). Quando as taxas de substituição das bases são homogêneas ao longo do tempo ou entre as linhagens em estudo, dados de distância genética podem ser comparados com as datas de eventos geológicos conhecidos para estimar o período de ocorrência de eventos vicariantes e de diversificação (BERMINGHAM & AVISE, 1986; PAGE, 1991; SIVASUNDAR *et al.*, 2001).

Vários estudos, incorporando informações filogenéticas, têm sido realizados descrevendo padrões biogeográficos para os peixes da América do Sul (WEITZMAN *et al.*, 1988; FARIAS *et al.*, 1998; REIS, 1998; WIMBERGER *et al.*, 1998; BEHREGARAY *et al.*, 2002). Estes trabalhos geralmente utilizam grupos de ampla distribuição, sobre os quais hipóteses de vicariância e/ou dispersão podem ser testadas. Sivasundar *et al.* (2001), utilizando seqüências de DNAMt, apresentaram uma hipótese filogenética para quatro espécies do gênero *Prochilodus*, representantes de quatro bacias hidrográficas distintas: Orinoco (Venezuela), Magdalena (Colômbia), Amazonas (Brasil e Peru) e Paraná. De acordo com os autores, a hipótese gerada é congruente com as evidências geológicas do isolamento inicial da bacia do Magdalena do clado formado por [Orinoco + (Amazonas + Paraná)]. Coronel *et al.* (2004), com base nos dados obtidos de marcadores nucleares e DNAMt, descreveram as relações entre as populações de duas espécies de ampla distribuição na América do Sul, *Brachyplatystoma flavicans* e *Pseudoplatystoma fasciatum*, procedentes dos rios Beni e Ichilo, na Amazônia boliviana, sugerindo eventos de restrição de fluxo gênico entre as populações estudadas. López-Fernández *et al.* (2005), utilizando vários marcadores

moleculares, estudaram 38 espécies de ciclídeos neotropicais e encontraram evidências de radiação rápida em um período de tempo relativamente curto.

Endemicidade é um conceito importante em Biogeografia de vicariância (WILEY, 1988; BROOKS & McLENNAN, 1991) porque encerra a noção de que as espécies evoluem em áreas isoladas. Por definição, uma espécie é endêmica se, e somente se, ela for exclusiva de sua área de ocorrência (COX & MOORE, 1993). Além disso, o percentual de organismos endêmicos pode ser utilizado para inferências sobre o tempo de isolamento da área (COX & MOORE, 1993).

Poucos estudos envolvendo grupos de ampla distribuição têm utilizado amostras de peixes da rede hidrográfica do Estado do Maranhão. Nesta região, geralmente considerada uma área de transição entre o semiárido nordestino e a floresta amazônica, está localizado um conjunto de rios perenes onde se destacam, no sentido leste-oeste, os rios Parnaíba, Itapecuru, Mearim, Pindaré e Gurupi. Além destes, parte da drenagem do Rio Tocantins flui em território maranhense.

De fato, poucos estudos sobre os peixes do Maranhão têm sido publicados, ocorrendo quase que uma ausência completa de informações sobre a sistemática, variação geográfica e biogeografia da ictiofauna da região.

Ao examinar os peixes do rio Itapecuru, por exemplo, Piorski *et al.* (1998) notaram que a maioria das espécies citadas para a região em Fowler (1941, 1951) tem sua localidade tipo nas Guianas ou na Amazônia. Piorski (1997), estudando o gênero *Platydoras* Bleeker, observou que *P. costatus* (L.), geralmente considerada de ampla distribuição (SABAJ & FERRARIS JR, 2003; FERRARIS JR, 2007) está restrita aos rios da Amazônia ao passo que os exemplares do rio Itapecuru e Mearim examinados compõem uma nova espécie (PIORSKI *et al.*, 2008). Tentativas de identificação de outras espécies a partir da descrição original têm sugerido que a discordância observada em *P. costatus* também possa ocorrer em

outras espécies, cujo padrão de distribuição incluía os rios do Maranhão e da Amazônia (PIORSKI *et al.*, 1998, 2003).

Portanto, estudos sobre as relações da ictiofauna maranhense e as demais bacias hidrográficas brasileiras são importantes, pois devem esclarecer alguns dos processos históricos envolvidos na evolução dos peixes de água doce do Brasil. Dentro desse contexto, o presente trabalho espera responder questões pertinentes à filogeografia de peixes nas principais bacias do Estado do Maranhão, centrados em análises das espécies *Hoplias malabaricus* e *Prochilodus lacustris*. A partir da análise de árvores gênicas dessas espécies e de uma revisão sobre a história geológica da região propõe-se uma hipótese filogeográfica para o conjunto hidrográfico do Maranhão, identificando-se alguns eventos históricos como possíveis explicações para as divergências e/ou similaridades entre as populações.

2 HISTÓRIA GEOMORFOLÓGICA DOS RIOS DO ESTADO DO MARANHÃO

Estudos de filogeografia estão centrados nas relações históricas de populações de organismos que, para serem compreendidas, precisam de fundamentação teórica baseada na história geológica da região em foco. Assim, a inserção e a correta interpretação do componente geográfico são fundamentais para a identificação dos momentos históricos em que os diferentes fatores evolutivos atuaram para a caracterização das populações atuais. Dentro desse contexto, o presente capítulo apresenta uma compilação da história geológica dos rios do Estado do Maranhão, faz uma breve análise da inserção da região nas áreas de endemismos propostas para a América do Sul e identifica os principais eventos que podem ter contribuído para a diversificação da ictiofauna. As informações deste capítulo darão, por conseguinte, subsídios para os argumentos apresentados nos capítulos posteriores.

2.1 *Hipóteses sobre a diversificação de vertebrados na América do Sul*

Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar a diversificação dos vertebrados na América do Sul. A maioria delas está restrita à distribuição da fauna amazônica, mas de certa forma, podem ser extrapoladas para outras áreas. A seguir, são apresentadas algumas hipóteses que, originalmente, foram propostas com base na distribuição de animais terrestres, mas que têm sido utilizadas com algumas adaptações para o entendimento da diversificação dos peixes de água doce.

Na *hipótese de rio como barreira*, tal como proposta por Sick (1967) para explicar a distribuição da avifauna amazônica, populações ancestrais amplamente distribuídas teriam sido divididas em subpopulações quando a drenagem do Amazonas se estabeleceu entre o final do Terciário e início do Quaternário. Assim, a formação do Amazonas teria

estabelecido uma barreira impedindo a troca de indivíduos entre populações situadas em margens opostas do rio.

Haffer (1997) listou uma série de dificuldades que esta hipótese enfrenta para explicar processos de especiação: 1) A ocorrência de meandros pode, com o tempo, promover conexão entre as duas margens quando o meandro for separado do rio; 2) Nas áreas de cabeceiras, os grandes rios deixam de atuar como barreiras sendo estas, portanto, áreas de contato entre as populações das duas margens; 3) Muitos grupos de animais são observados em ambas as margens do Amazonas, aparentemente sem nenhuma diferença fenotípica; 4) Ocorrência de zonas de contato secundário.

Se, por um lado, a hipótese de rio como barreira tem suas limitações para explicar a diferenciação de espécies pode, por outro lado, ser utilizada para explicar a origem de variação geográfica em animais com baixa capacidade de dispersão. Entretanto, mesmo no caso de diferenciação de populações, esta hipótese apenas deve ser aplicada quando um rio, por suas dimensões, representa uma barreira à dispersão de peixes entre os tributários de margens opostas.

Haffer (1993 a, b) combinou as premissas da hipótese anterior com aquelas da Teoria dos Refúgios em um modelo “*rio-refúgio*”. Segundo este modelo, as diferenciações promovidas entre populações de margens opostas de um rio seriam incrementadas pelo estabelecimento de refúgios nessas margens, decorrentes das flutuações climáticas do Pleistoceno. Muito embora esta hipótese possa explicar alguns padrões de distribuição e diferenciação de vertebrados terrestres (AYRES & CLUTTON-BROCK, 1992; CAPPARELLA, 1991), é muito difícil conceber como o modelo poderia ser aplicado à distribuição e diferenciação dos peixes de água doce.

A *teoria dos refúgios* postula que oscilações climáticas durante o Pleistoceno (2 Ma) teriam provocado períodos de fragmentação da floresta na Amazônia, alternados por

períodos de coalescência das áreas fragmentadas. As áreas fragmentadas, neste modelo, atuam como refúgios para as espécies com habitats florestais. Uma vez isoladas nos fragmentos, as populações se diferenciariam, podendo culminar em novas espécies, quando um novo evento de coalescência de área ocorresse.

Weitzman & Weitzman (1982), em uma análise da distribuição dos gêneros *Carnegiella* e *Nannostomus*, consideram que a tênue relação com os refúgios postulados para a Amazônia está mais associada à deficiência na qualidade da informação disponível, do que a uma relação real. Se a teoria dos refúgios pode ser aplicada aos peixes de água doce, esta deve prever apenas variações intraespecíficas. Acima do nível de espécie, possíveis diferenciações associadas aos refúgios tendem a ser mascarados por dispersão subsequente (WEITZMAN & WEITZMAN, 1982).

A teoria dos refúgios ainda é muito debatida, com as discussões centradas principalmente na existência ou não de dados suficientes que indiquem a existência de fragmentos da forma prevista pelo modelo. Um problema conceitual importante, levantado por Connor (1986), diz respeito ao critério de endemismo utilizado para definição de refúgios. Na visão do autor, a identificação de refúgios com base no número de espécies endêmicas sugere uma confusão entre “centro de endemismo” e “centro de dispersão”. Recentemente, Bush & Oliveira (2006) analisaram um conjunto de dados palinológicos de sedimentos lacustres da Amazônia, depositados nos últimos 20.000 anos, e concluíram que a hipótese dos refúgios não tem apoio em dados botânicos.

Estudos em peixes, baseados em dados moleculares, sugerem um estágio de diversificação da fauna entre 10 Ma e 3 Ma (LOVEJOY & DE ARAÚJO, 2000; MONTOYA-BURGOS, 2003; HUBERT *et al.*, 2007) que, da mesma forma que os dados palinológicos, não suportam a hipótese de que as perturbações climáticas do Pleistoceno tenham contribuído significativamente para a diferenciação da biota aquática.

A *hipótese de gradiente* (ENDLER, 1982) prevê especiação parapátrica através de gradientes ambientais sem que haja isolamento das populações. Neste modelo, centros de diversidade correspondem a zonas de relativa uniformidade ambiental, ao passo que zonas de mudanças correspondem a zonas de mudanças ambientais. Este modelo tem sido refutado por alguns autores (HAFFER, 1997), principalmente devido às dificuldades de estudo de modelos envolvendo especiação parapátrica, pois as previsões filogenéticas e biogeográficas não são muito diferentes do modelo de especiação alopátrica (BROOKS & MCLENNAN, 1991).

A *hipótese paleogeográfica*, proposta por Emsley (1965), prevê que o padrão de distribuição das espécies atuais é resultado das mudanças pretéritas ocorridas na paisagem, responsáveis pelos eventos repetidos de separação e reconexão de populações. Estas mudanças podem ter sido causadas por movimentos da massa terrestre, tais como elevação ou subsidência tectônica, atingindo grandes áreas, ou podem ter sido mais localizadas como, por exemplo, a elevação de uma montanha ou um arco geológico. Também, as mudanças na paleogeografia podem ter sido provocadas por variações periódicas no nível do mar, alternando entre períodos secos e úmidos.

De acordo com esta hipótese, clados irmãos de linhagens intraespecíficas ou de grupos de espécies serão observados entre rios separados pela elevação de paleoarcos (HUBERT *et al.*, 2007). Como consequência, a hipótese paleogeográfica está relacionada principalmente com a identificação de eventos vicariantes, responsáveis pela diferenciação alopátrica de populações.

Montoya-Burgos (2003) propôs a *hipótese hidrogeológica* para explicar a diversificação do gênero *Hypostomus* na América do Sul. De acordo com o modelo, as forças responsáveis pela diferenciação das espécies de peixes de água doce neotropicais são resultantes das mudanças climáticas e/ou geomorfológicas, responsáveis pela modelagem dos padrões hidrogeológicos dos rios. Assim, a formação de divisores de drenagens, mudanças

nos cursos dos rios e incursões-regressões marinhas produziriam eventos vicariantes, contribuindo para a diferenciação da biota aquática.

Esta hipótese é muito similar à *paleogeográfica*, uma vez que ambas são assentadas nas alterações geomorfológicas responsáveis pelas mudanças nos cursos dos rios. Entretanto, as duas podem ser diferenciadas de acordo com a “fonte” geradora de diversidade. Enquanto que na *hipótese paleogeográfica* a diversidade é gerada principalmente pela elevação de arcos orogenéticos, na *hipótese hidrogeológica* os fatores mais importantes são os eventos de captura de cabeceira e as rotas de dispersão temporária (HUBERT & RENNO, 2006).

O modelo prevê que: 1) linhagens comuns a cabeceiras distintas serão observadas em um mesmo clado devido a eventos de dispersão; e 2) as espécies aumentam sua área de distribuição por dispersão, com isolamento subsequente das populações (HUBERT *et al.*, 2007).

A *hipótese Museu* (FJELDSA, 1994; NORES, 1999) é mais especificamente relacionada às incursões marinhas. As alterações no nível do mar teriam atuado como um evento vicariante, promovendo especiação. As partes mais altas dos rios teriam suas características limnológicas preservadas durante estes episódios e, portanto, atuariam como refúgios de água doce (HUBERT & RENNO, 2006). Com a regressão posterior do nível do mar, as espécies se dispersariam para as partes mais baixas, onde se espera encontrar maior número de espécies e o menor nível de endemismo.

Sob uma perspectiva populacional, este modelo prevê baixa diversidade genética dentro das áreas de refúgio, diferenciação entre as áreas de refúgio, alta diversidade genética dentro das áreas colonizadas e potencial ausência de diferenciação entre áreas de refúgio e colonizadas (FARIAS & HRBEK, 2008).

2.2 Áreas de endemismo para peixes de água doce na região Neotropical

A definição de regiões zoogeográficas é centrada principalmente no conceito de endemismo, segundo o qual a evolução de espécies em áreas isoladas é determinada pela atuação de eventos vicariantes (BROOKS & MCLENNAN, 1991). De modo geral, apesar do risco de confusão entre “centro de endemismo” e “centro de dispersão” (CONNOR, 1986), a identificação e as estimativas do tempo de isolamento de tais regiões têm sido realizadas pela quantificação de espécies endêmicas (COX & MOORE, 1993) e, também, pela análise combinada de cladogramas de espécies e de áreas (p.ex. HUBERT & RENNO, 2006).

Áreas de endemismo para os peixes da América do Sul foram propostas em, pelo menos, três trabalhos importantes. Gery (1969) reconheceu oito regiões faunísticas (Figura 2-1): 1) Orinoco-Venezuela; 2) Magdalena; 3) Trans-Andina; 4) Andina; 5) Paraná; 6) Patagônia; 7) Guiana-Amazônica, onde estariam inseridos os rios maranhenses; e 8) Leste do Brasil, formada pela bacia do rio São Francisco, pelos riachos costeiros do nordeste brasileiro acima do rio São Francisco e pelos riachos costeiros da região sudeste do Brasil. Da discussão apresentada por Gery (1969), é possível inferir que o autor sugere a ocorrência de grande similaridade entre a ictiofauna dos rios maranhenses e a ictiofauna amazônica, da qual ela teria sido derivada.

De acordo com esta hipótese, compartilhada por Weitzman & Weitzman (1982), a fauna antiga do escudo da Guiana teria se dispersado pelos rios pretéritos da Amazônia e colonizado os rios do nordeste do Brasil. Da mesma forma, Garavello *et al.* (1998) argumentam que a ictiofauna dos Lençóis Maranhenses seja representada por remanescentes das espécies que ocorrem nos rios do Maranhão que, por sua vez, seria essencialmente similar à ictiofauna amazônica, tal como previsto por Gery (1969) e Menezes (1970).

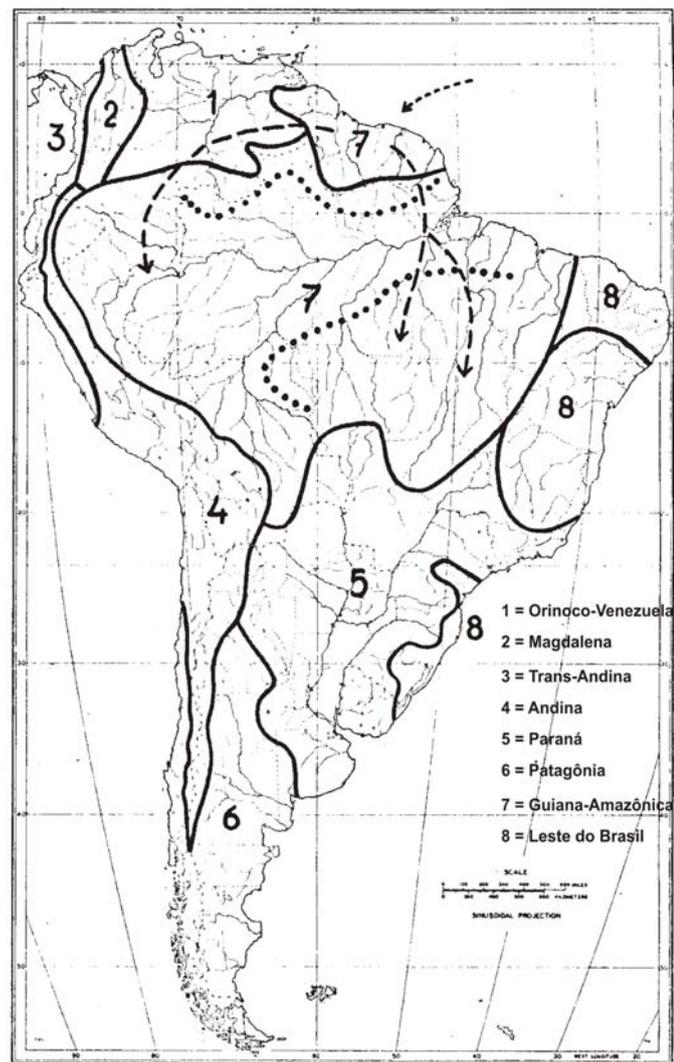


Figura 2-1. Áreas de endemismo para peixes neotropicais propostas por Gery (1969).

O segundo trabalho importante sobre áreas endêmicas na América do Sul foi desenvolvido por Vari (1988), que identificou 14 regiões de endemismo para a família Curimatidae (Figura 2-2). Na região a oeste da cordilheira dos Andes, além das áreas endêmicas do Magdalena e Maracaibo, foram reconhecidas quatro áreas menores, correspondendo às bacias dos rios Atrato, Patia, Guayas e Chira. A leste, as áreas endêmicas do Orinoco, Guianas, Amazônia, Nordeste, São Francisco, Costeira, Alto Paraná e Paraguai foram assinaladas.



Figura 2-2. Áreas de endemismo para a família Curimatidae propostas por Vari (1988).

Ao contrário de Gery (1969), Vari (1988) separa os rios do Maranhão da região zoogeográfica do Amazonas, agrupando-os com o conjunto de rios intermitentes do nordeste do Brasil, acima da drenagem do rio São Francisco. Com base na distribuição dos curimatídeos, este autor considera que as regiões endêmicas do nordeste e do São Francisco são áreas híbridas, onde ocorrem elementos que são aparentados das espécies do Amazonas ou da região costeira. A relação entre a fauna do nordeste e do Amazonas foram sustentadas, posteriormente, pelas revisões de Vari (1989a, 1989b) dos gêneros *Curimata* Bosc, 1817 e *Psectrogaster* Eigenmann & Eigenmann, 1889 utilizando material dos rios Parnaíba e Tocantins. Este padrão também pode ser observado em *Poptella compressa* (Günther, 1864) citada para os rios nordestinos e para os rios da Guiana, Orinoco e Amazonas (REIS, 1989).

O caráter híbrido dos rios do nordeste brasileiro, tal como inferido para os curimatídeos, também pode ser observado em *Triportheus* Cope, 1872. Revisando este gênero, Malabarba (2004) redescreve *T. signatus* (Garman, 1890) com base em exemplares da Paraíba, Maranhão, Ceará e Piauí, e assinala que a espécie faz parte de um grupo de peixes de corpo alto, onde são listadas espécies das bacias do Amazonas, Orinoco, Tocantins, Paraguai e São Francisco.

Recentemente, Lucena (2003) estudou o gênero *Roeboides* Günther, 1864 e propôs uma nova espécie para as bacias dos rios Parnaíba e Pindaré-Mearim, cujo parente mais próximo ocorre no rio Paraguai. A análise deste gênero mostra, assim, um padrão discordante da visão tradicional de que os parentes mais próximos das espécies do nordeste do Brasil devem ser encontrados na bacia amazônica. Ao mesmo tempo, a biogeografia de *Roeboides* sugere que a ictiofauna dos rios do nordeste deve apresentar uma história evolutiva mais complexa do que a simples dispersão a partir dos rios da Guiana ou Amazônia.

O terceiro trabalho importante sobre a distribuição dos peixes sul-americanos foi o de Lundberg *et al.* (1998). Este trabalho foi mais amplo do que os dois anteriores porque, além da distribuição das espécies, também leva em consideração os limites e a história geológica de cada bacia hidrográfica para delimitação de áreas de endemismo (Figura 2-3). A área identificada como nordeste do Brasil por Vari (1988), por exemplo, pode ser seccionada em três, correspondendo aos rios do Maranhão e rio Capim (PA), bacia do Parnaíba e rios do nordeste acima do São Francisco.

Recentemente, Hubert & Renno (2006) discutiram a biogeografia dos peixes da América do Sul através de uma análise de parsimônia de endemicidade (PAE), aplicando uma abordagem de verossimilhança sobre dados de distribuição de Characiformes. Nesta análise, os autores identificaram 11 áreas de endemismo com algumas diferenças em relação ao trabalho de Lundberg *et al.* (1998). Apenas considerando a área geográfica do presente

estudo, Hubert & Renno (2006) sugerem que a unidade hidrológica Maranhão – composta pelos rios do Estado do Maranhão e rio Capim (PA) – constitui uma área de endemismo, ao mesmo tempo em que a área de endemismo Parnaíba seria composta pelo rio Parnaíba e os rios do nordeste acima do rio São Francisco (Figura 2-4).



Figura 2-3. Áreas de endemismo para peixes neotropicais de acordo com Lundberg *et al.* (1998).

Hubert & Renno (2006) observaram, ainda, que cerca de 94% das espécies que ocorrem no Maranhão e cerca de 65% da fauna de Characiformes do Parnaíba não são endêmicas. Em números absolutos, estas porcentagens correspondem a um baixo endemismo para o Maranhão (duas espécies) e um endemismo moderado para o Parnaíba (41 espécies).



Figura 2-4. Áreas de endemismo para a região neotropical propostas por Hubert & Renno (2006) com base na distribuição de peixes da ordem Characiformes.

Nos últimos anos o conhecimento sobre a fauna de peixes da região compreendida entre os rios Parnaíba e Tocantins tem se acumulado, revelando endemismos e sugerindo a ocorrência de um conjunto de espécies que, embora relacionadas às amazônicas, parecem ser diferentes destas. *Brachyhalcinus parnaibae* da subfamília Stethaprioninae foi descrita por Reis (1989) para o Rio Parnaíba. Triques (1999) descreveu *Rhamphichthys atlanticus* para o Lago de Viana, no sistema Pindaré-Mearim, enquanto que Ferraris Jr & Vari (1999) nomearam *Auchenipterus menezesi* para os rios Pindaré-Mearim e Parnaíba. Os trabalhos mais recentes que citam novas espécies para a região são os de Staeck & Schindler (2006) que descreveram *Geophagus parnaibae* com base em exemplares do Rio Parnaíba, Lucena (2007) que identificou *Roeboides sazimai* nos rios Pindaré-Mearim e Parnaíba, e

Piorski *et al.* (2008) com a designação de uma nova espécie de *Platydoras* para os rios Parnaíba, Mearim e Itapecuru.

Em suma, as novas descrições de espécies associadas às características fisiográficas únicas dessa região sustentam a hipótese de que o conjunto de rios compreendido entre o Tocantins e o Parnaíba constitui uma unidade zoogeográfica distinta das demais regiões da América do Sul.

Em 2005, a Secretaria de Recursos Hídricos do Ministério do Meio Ambiente (SRH/MMA) definiu 25 ecorregiões aquáticas para o território brasileiro, a partir da distribuição das espécies de peixes, integradas com informações de geologia, relevo e hidrografia (Figura 2-5). Para este trabalho, os técnicos e consultores da SRH/MMA assumiram como ecorregião “*um conjunto de comunidades naturais, geograficamente distintas, que compartilham a maioria das suas espécies, dinâmicas e processos ecológicos, bem como condições ambientais similares, que são fatores críticos para a manutenção de sua viabilidade em longo prazo*”.

Dentro dessa divisão, os rios amostrados nesse estudo fazem parte de três ecorregiões diferentes: Gurupi-Golfão Maranhense, Tocantins-Araguaia e Maranhão-Piauí. A ecorregião Gurupi-Golfão Maranhense inclui a drenagem do Rio Gurupi, seguindo para leste até o Rio Itapecuru, abrangendo os rios Turiaçu, Pindaré, Grajaú e Mearim; a ecorregião Tocantins-Araguaia inclui as bacias de drenagem dos rios Tocantins e Araguaia; a ecorregião Maranhão-Piauí inclui toda a bacia de drenagem do Rio Parnaíba e drenagens costeiras, desde a bacia do Rio Munim, no Maranhão, até a bacia do Rio Piranji, com cabeceiras no Ceará, tendo como principais rios: Poti, Longá, Piauí, Gurguéia, Munim, e Rio das Balsas.

De acordo com a SRH/MMA (2005), a ecorregião Tocantins-Araguaia é a que apresenta maior número de espécies de peixes inventariadas, havendo provavelmente uma subestimação das cerca de 300 espécies listadas para a região. A ecorregião Maranhão-Piauí

apresenta um número considerável de espécies endêmicas, podendo representar uma transição entre as faunas mais ocidentais, desde o Escudo das Guianas ao Golfão Maranhense, e a fauna da ecorregião da Caatinga-Costa Nordeste. A ictiofauna da ecorregião do Gurupi-Golfão Maranhense seria a mais pobremente conhecida, provavelmente intermediária entre aquela do Rio Parnaíba e dos rios do leste do Pará.

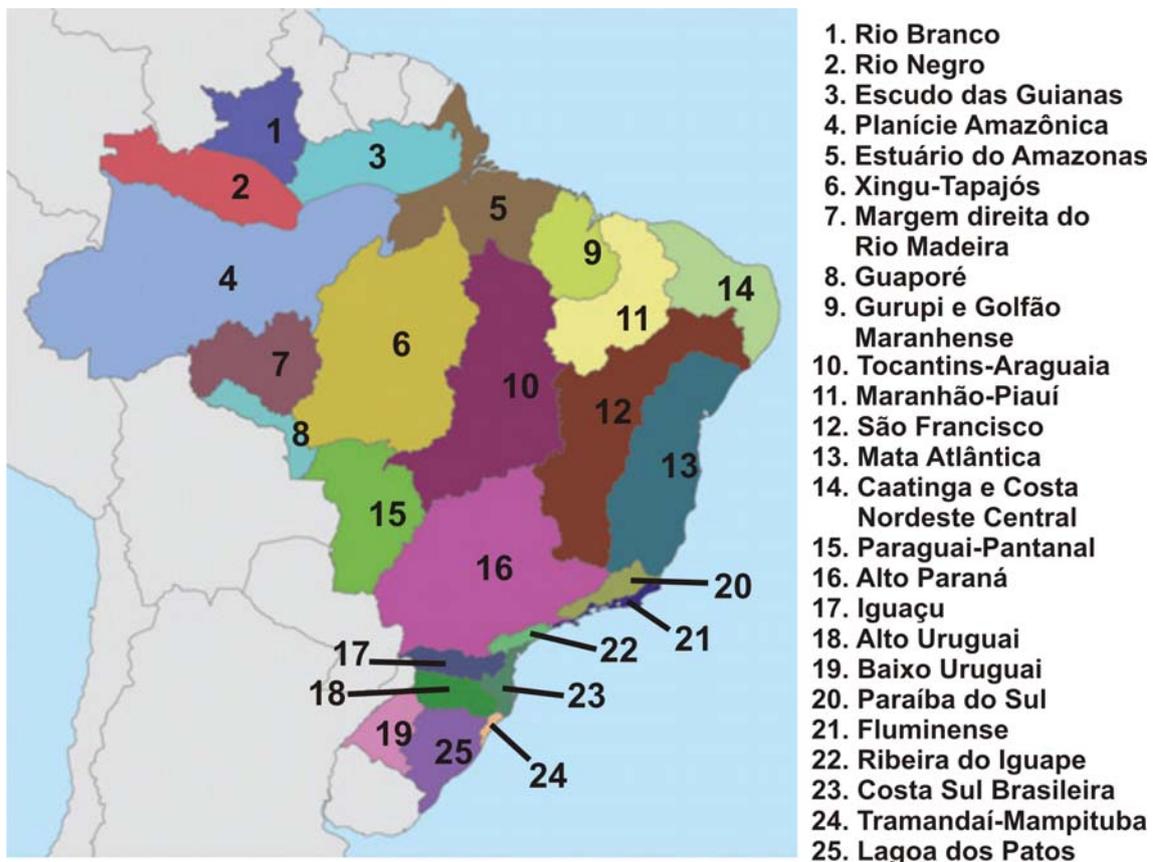


Figura 2-5. Ecorregiões aquáticas do Brasil definidas pela SRH/MMA (2005).

2.3 Características da Paisagem

2.3.1 Relevo

Oficialmente, o Estado do Maranhão faz parte da Região Nordeste. Entretanto, um conjunto de características ambientais o diferencia dos demais estados nordestinos,

principalmente porque muitas dessas características são comuns às regiões norte, centro-oeste e nordeste, tal como evidenciado pela divisão de seu território em nove Regiões Ecológicas e 31 sub-regiões (FEITOSA & TROVÃO, 2006) (Figura 2-6). Até o início dos anos setenta, a localização intermediária do Maranhão entre as macrorregiões era destacada pela composição, juntamente com o Piauí, da região Meio-Norte, nome abolido mais tarde quando o IBGE adotou o sistema de Macrorregiões Geográficas (FEITOSA & TROVÃO, 2006).

O relevo do território maranhense apresenta elevação máxima de 800m com as seguintes unidades geomorfológicas: Chapadões, Chapadas e “Cuestas”, Superfície Maranhense com Testemunhos, Golfão Maranhense, Lençóis Maranhenses e Litoral de “Rias” (IBGE,1984). Entretanto, Feitosa & Trovão (2006) consideram que, conforme as convenções admitidas para as formas de relevo, no Maranhão podem ser identificadas apenas Planície, Planalto e Depressões. A Planície corresponde a cerca de 60% do território com elevação de até 100 m, onde podem ser diferenciados os ambientes: Planície Sublitorânea, Planície Litorânea, Planície Costeira e Planície Fluvial.

Os trechos baixos dos rios estão localizados na Planície Fluvial, cuja maior penetração para o interior acompanha os vales dos rios que desembocam no Golfão Maranhense. Um ambiente importante nesta unidade geomorfológica é a Baixada Maranhense, modelada pela convergência dos rios Mearim, Pindaré e Grajaú sob influência de estruturas neotectônicas quaternárias (COSTA *et al.*, 1997), associada a movimentos transgressivos e regressivos do mar. O relevo da Planície foi bastante influenciado por falhas transcorrentes e normais desenvolvidas durante o Quaternário (ca. 2,6 Ma). Estas falhas possibilitaram o desenvolvimento de colinas com altitude variando de 35 a 70 m na região noroeste do Maranhão e, também, de mesas formando interflúvios tabulares com altitudes em torno de 110 m na borda sul da Baixada Maranhense (COSTA *et al.*, 1997).

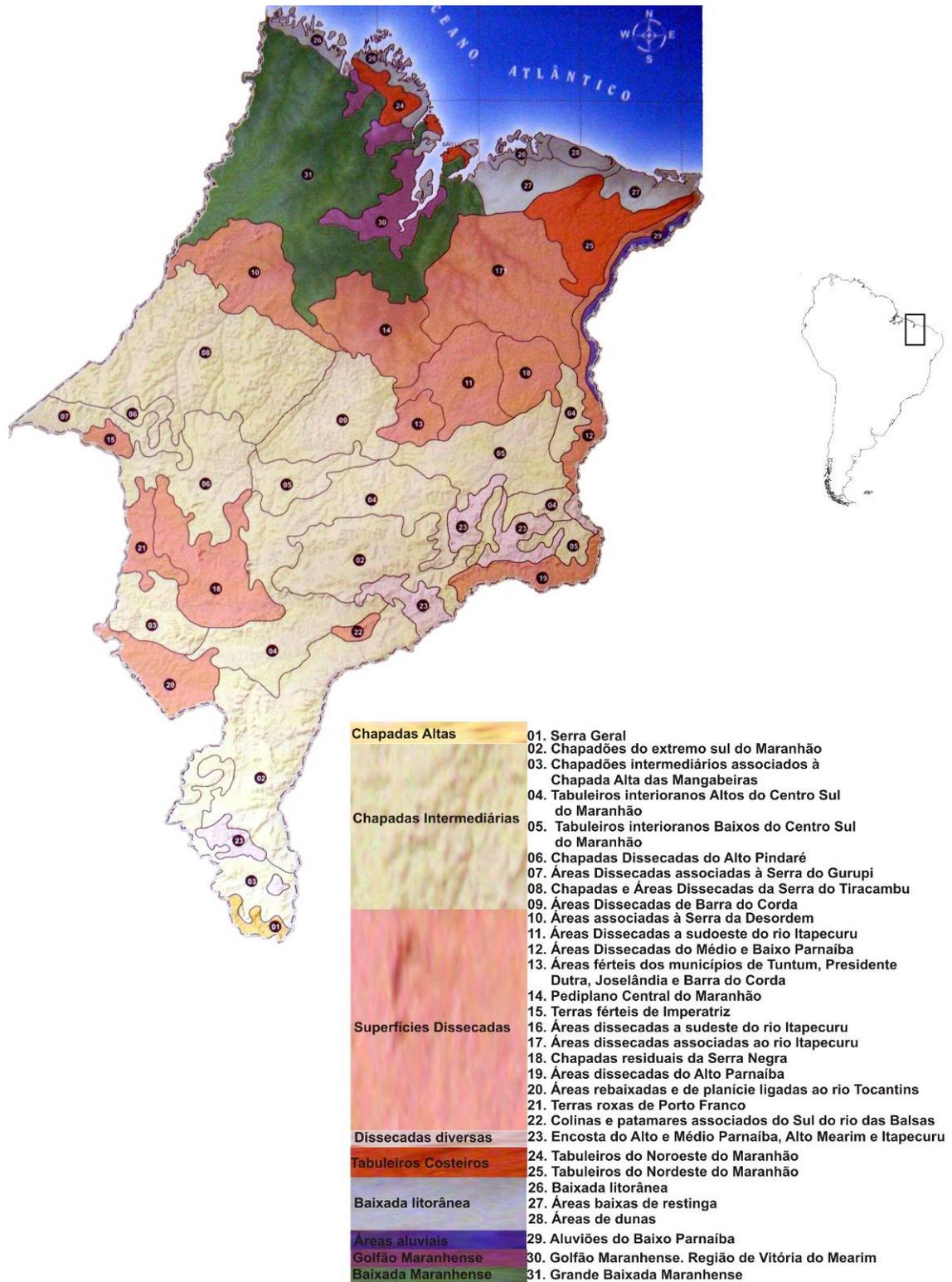


Figura 2-6. Domínios geoambientais e regiões ecológicas do Estado do Maranhão. Modificado de Feitosa & Trovão (2006).

O Centro-Sul do Estado abriga as áreas de Planalto, com altitudes entre 200 e 800 metros, subdividindo-se nas seguintes unidades geomorfológicas: Pediplano Central, Planalto Oriental, Planalto Ocidental, Depressão do Balsas e Planalto Meridional.

As principais vertentes hidrográficas estão localizadas na Chapada das Mangabeiras, na Serra do Tiracambu e suas extensões (serras do Gurupi e da Desordem), na Serra da Menina e no sistema formado pelas serras da Crureira, Itapecuru e Alpercatas. Este conjunto geomorfológico forma e individualiza as bacias hidrográficas dos rios Gurupi, Turiaçu, Maracaçumé-Tromaí, Uru-Pericumã-Aurá, Mearim, Itapecuru, Tocantins, Parnaíba, Munim e outros rios menores sobre a bacia de Barreirinhas. De modo geral, os terrenos mais altos e de idade superior ao Jurássico estão situados abaixo da latitude 6°S. Sendo assim, a Serra do Tiracambu e suas extensões compreendem os divisores de água mais recentes, datadas do Mioceno-Plioceno (ca. 5,3 Ma) (COSTA *et al.*, 1997).

2.3.2 Características hidrográficas da área de estudo

A composição da drenagem, na área de estudo, apresenta um padrão dendrítico-retangular e os traçados dos rios são controlados por estruturas tectônicas geradas e reativadas no Mesozóico com direções N-S, ENE-WSW, NE-SW e NW-SE (MARTINS *et al.*, 2007). Três regiões hidrográficas podem ser identificadas: Tocantins-Araguaia, Atlântico Nordeste Ocidental e Parnaíba (MMA, 2006a).

2.3.2.1 Região Hidrográfica Tocantins-Araguaia

A RH Tocantins-Araguaia ocupa uma área de 918.273 km², incluindo os estados de Goiás, Tocantins, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Goiás. A maior parte da RH está

localizada na Região Centro-Oeste, com 20% da sua superfície no estado do Pará e apenas 3,8% no estado do Maranhão (MMA, 2006b) (Figura 2-7).

O Rio Tocantins nasce no Planalto de Goiás, a cerca de 1000 m de altitude, sendo formado pelos rios das Almas e Maranhão, com extensão total aproximada de 1.960 km até a sua foz no Oceano Atlântico (MMA, 2006b). O trecho inferior tem início próximo à cidade de Marabá-PA, logo após o rio constituir os limites entre os estados do Maranhão, Pará e Tocantins. Nesse trecho a maior parte do seu curso está instalada sobre sedimentos Pós Barreiras de idade Plio-Pleistocênica (ca. 2,6 Ma) (ROSSETTI & VALERIANO, 2007).

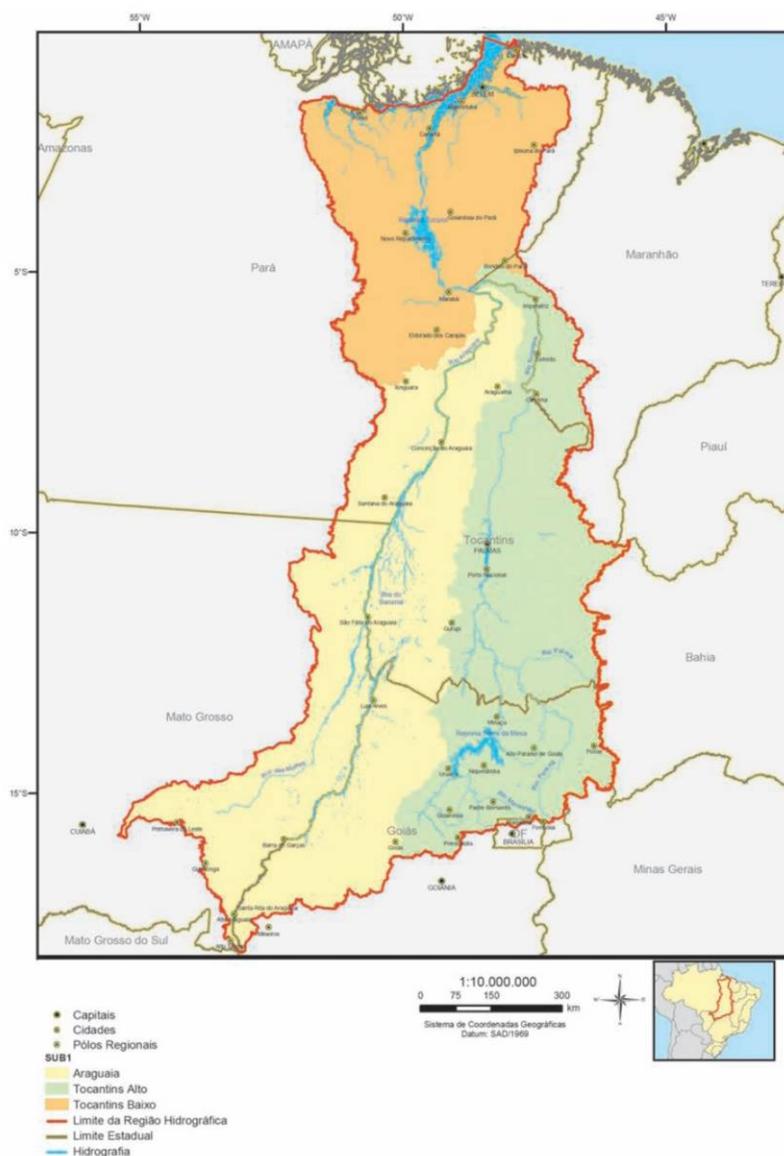


Figura 2-7. Limites da Região Hidrográfica Tocantins-Araguaia. Modificado de MMA (2006b).

2.3.2.2 Região Hidrográfica Atlântico Nordeste Ocidental

A RH Atlântico Nordeste Ocidental abrange uma área de 268.897 km², contemplando as drenagens genuinamente maranhenses e as drenagens costeiras do nordeste do Estado do Pará (Figura 2-8). A região é subdividida em três sub-bacias: Gurupi, Itapecuru e Mearim. A sub-bacia Gurupi compreende o Rio Gurupi, os rios do litoral paraense e as microbacias dos rios Pericumã e Turiaçu; a sub-bacia Itapecuru é composta pelos rios da Ilha de São Luís e pelas drenagens do litoral oriental do Maranhão formadas pelos rios Periaí, Preguiças e Munim; a sub-bacia Mearim abrange os rios Mearim, Pindaré, Grajaú, Flores e Zutiua e seus afluentes (MMA, 2006c).



Figura 2-8. Limites da Região Hidrográfica Atlântico Nordeste Ocidental. Modificado de MMA (2006c).

a) Rio Gurupi

O Rio Itinga nasce na Serra do Gurupi ($5^{\circ}15'S$ $47^{\circ}16'W$), extensão da Serra do Tiracambu, em terrenos com cotas superiores a 300 metros de altitude, próximo a uma região onde também estão implantadas nascentes de formadores do Rio Tocantins. A cerca de 14 km acima do município de Campestre do Maranhão ocorre a confluência entre os rios Itinga e Açailândia, originando o Rio Gurupi. O trecho médio superior corre sobre terrenos cretáceos, enquanto o trecho inferior corta o Grupo Gurupi (de idade pré-cambriana) e flui sobre um leito rochoso formando várias cachoeiras. Após um percurso de mais de 400 km, durante o qual constitui o limite interestadual Pará-Maranhão, deságua no Oceano Atlântico através da baía de Gurupi ($1^{\circ}6'S$ $46^{\circ}2'W$).

A Serra do Tiracambu constitui o principal divisor de águas da bacia do Rio Gurupi, estabelecendo o limite com as bacias do Pindaré, Turiaçu, Tocantins e Capim.

b) Rio Turiaçu

A bacia hidrográfica do Rio Turiaçu é considerada secundária, situada na porção ocidental do território maranhense. Esta é uma bacia pequena, onde o rio principal tem cerca de 275 km de extensão. Sua cabeceira está situada na Serra da Desordem ($3^{\circ}10'S$ $46^{\circ}30'W$), extensão da Serra do Tiracambu, em terrenos com cotas de 200 a 300 metros de altitude. A maior parte do rio corre por terrenos baixos até desaguar na Baía de Turiaçu ($1^{\circ}43'S$ $45^{\circ}18'W$), com o trecho médio-superior assentado sobre a Formação Itapecuru (Cretáceo), enquanto a parte baixa, caracterizada pela formação de lagos na altura do município de Santa Helena, flui sobre aluviões flúvio-marinhos, datados do Quaternário.

O Rio Turiaçu, juntamente com as bacias hidrográficas do Mracaçumé-Tromai e Uru-Pericumã-Aurá, reúnem rios de trajetos curtos, mas caudalosos e piscosos, com características amazônicas. Todos estão sob constante influência das marés, apresentando grandes larguras próximas à foz, orlados pela vegetação de mangue (IBGE, 1997). O rio é de

regime equatorial que, devido à pluviosidade da região, assemelha-se aos afluentes meridionais do Amazonas (MMA, 2006c).

c) Rio Pindaré

O Rio Pindaré, juntamente com os rios Munim, Itapecuru e Mearim constitui o conjunto de bacias hidrográficas genuinamente maranhenses desaguando no Golfão Maranhense. A nascente está localizada na Serra do Gurupi ($5^{\circ}49'S$ $46^{\circ}53'W$) em cotas acima de 300 metros de altitude. A partir da nascente, o rio corre com poucos meandros no sentido sul-norte até próximo ao município de Bom Jesus das Selvas, quando assume a direção sudoeste-nordeste. Próximo a Alto Alegre do Pindaré o curso é novamente alterado, agora para o rumo oeste-leste até as imediações de Pindaré-Mirim. A partir deste ponto, o rio torna-se meandrante formando grandes lagos na região da Baixada Maranhense, tais como os de Viana e Penalva, e retorna ao curso sudoeste-nordeste até desaguar no Rio Mearim ($3^{\circ}18'S$ $44^{\circ}48'W$), após um percurso de cerca de 436 km. O trecho médio superior flui sobre terrenos da Formação Itapecuru (Cretáceo), enquanto o trecho inferior está assentado sobre terrenos quaternários.

Considerada uma bacia isolada das demais da região, os principais divisores de água estão localizados nas serras do Gurupi e Tiracambu, que separam os afluentes da margem esquerda das cabeceiras do Rio Gurupi e de afluentes dos rios Tocantins e Turiaçu. Extensões da Serra do Tiracambu também separam os afluentes da margem direita da bacia hidrográfica do Rio Grajaú.

d) Rio Mearim

O Ribeirão Água Boa, principal formador do Rio Mearim, nasce na Serra da Menina a 650 m de altitude ($6^{\circ}41'S$ $46^{\circ}22'W$). Nessa mesma região, podem ser observados formadores dos rios Grajaú, Parnaíba e Tocantins. O Rio Mearim, com cerca de 930 km de extensão, assume durante longo trajeto direção sudoeste-nordeste até proximidades de

Esperantinópolis. Neste ponto, após receber o afluente Flores, direciona-se para norte, permanecendo mais ou menos neste rumo até desembocar na baía de São Marcos ($2^{\circ}45'S$ $44^{\circ}28'W$), onde se bifurca em dois braços contornando a Ilha dos Caranguejos. A partir de Bacabal, a meandricidade do rio torna-se mais acentuada, ocorrendo formação de vários lagos. Dentre estes, destaca-se o Lago Açú, considerado um dos maiores e mais importante da região, localizado próximo à confluência com o Rio Grajaú e responsável pelo pescado comercializado em quase toda a área central do estado. A maior parte do seu curso está assentada sobre terrenos cretáceos da Formação Itapecuru, com apenas o trecho mais inferior correndo sobre terrenos quaternários.

e) Rio Itapecuru

O Rio Itapecuru nasce no sul do Estado do Maranhão no sistema formado pelas serras de Cruzeiras, Itapecuru e Alpercatas ($6^{\circ}41'S$ $45^{\circ}50'W$), a cerca de 530 m de altitude. Partindo de suas nascentes, corre inicialmente na direção oeste-leste até Várzea, onde toma rumo norte até a barra do Rio Alpercatas. Deste ponto em diante, muda de direção para nordeste até encontrar o Rio Correntes, onde subitamente inflete para norte por um pequeno trecho, retomando o curso nordeste até as proximidades de Caxias. Nesta localidade, uma súbita inflexão ocorre para noroeste, mantida até Cantanhede, quando o curso muda para norte em direção à Baía do Arraial, onde está implantada sua foz ($2^{\circ}49'S$ $44^{\circ}11'W$). Seu curso, de aproximadamente 1050 km de extensão, tem o trecho superior localizado entre as nascentes e o município de Colinas. O trecho médio inicia-se neste e segue até Caxias, onde começa o trecho inferior.

O Rio Itapecuru é caracterizado por poucos meandros com o trecho superior, até as proximidades de Colinas, correndo sobre a Formação Sambaíba (Triássico) e o restante assentado sobre terrenos cretáceos (Formação Itapecuru).

Os rios Itapecuru e Mearim têm, grosso modo, o mesmo padrão geral de drenagem, com direções de curso quase paralelas e mudanças destes ocorrendo mais ou menos na mesma latitude, sugerindo que os rios estão submetidos a um forte controle tectônico. Entretanto, seus trechos inferiores apresentam características diferentes com a formação sistemática de meandros e lagos no Rio Mearim e ausência destes no Rio Itapecuru.

2.3.2.3 Região Hidrográfica do Parnaíba

A RH do Parnaíba ocupa uma área de 331.441 km², distribuída entre os estados do Piauí, Maranhão e Ceará (MMA, 2006d) (Figura 2-9). Entretanto, a maior parte desta está localizada no Estado do Piauí, onde podem ser encontrados vários rios intermitentes. Suas águas atravessam diferentes biomas, como o Cerrado, no Alto Parnaíba, a Caatinga, no Médio e Baixo Parnaíba, e o Costeiro, no Baixo Parnaíba, tornando diferenciadas as características hidrológicas de cada uma destas regiões (MMA, 2006d).

O Rio Parnaíba nasce na Chapada das Mangabeiras a mais de 800 m de altitude, no extremo sul do Maranhão (10°15'S 45°50'W) sob o nome de riacho Água Quente e desemboca em forma de delta entre as baías do Caju e das Canárias (2°21'S 43°55'W), após um percurso de aproximadamente 1.400 km. A partir da nascente, o curso segue rumo norte margeado pelas serras do Penitente e Grande até a confluência com o Rio Medonho, onde apresenta leve mudança para nordeste, mantendo-o até Nova Iorque. Neste ponto, o curso sofre uma súbita inflexão para leste, mantida até Floriano, onde uma nova curva altera o rumo para Norte. Próximo a Duque Bacelar, o rio começa a fluir em direção a nordeste, cujo rumo se torna mais acentuado próximo a Santa Quitéria, persistindo até a foz.

A maior parte do seu curso flui sobre terrenos antigos, tais como, Formação Pedra do Fogo e Formação Poti datadas do Paleozóico. Apenas parte do trecho inferior, já próximo à desembocadura, corre sobre terrenos quaternários.



Figura 2-9. Limites da Região Hidrográfica do Parnaíba. Modificado de MMA (2006d).

2.4 *História geológica*

2.4.1 **Bacias sedimentares**

Lundberg *et al.* (1998) apresentaram uma revisão da história geológica da América do Sul associada, principalmente, com a evolução das drenagens amazônicas em suas porções norte e noroeste do continente, discutindo superficialmente as implicações dos eventos geológicos para as demais regiões. Parte dessa lacuna foi preenchida por Ribeiro (2006) que discutiu a evolução das drenagens costeiras do leste do Brasil, contextualizando-a com a história tectônica da área. Apesar da importância do trabalho de Ribeiro (2006), algumas das relações históricas assumidas pelo autor para os rios da Província Parnaíba são extrapolações da dinâmica geológica apresentada para a Província Borborema. Dessa forma, uma lacuna sobre a interação *história geológica-evolução de rios* permanece para a área de abrangência da bacia sedimentar do Parnaíba. Boa parte do desconhecimento pode ser atribuída à dificuldade em se encontrar sínteses de estudos geológicos de boa qualidade e acessíveis para ictiologistas, bem como à ausência de estudos sobre a evolução da bacia do Parnaíba, uma vez que a maioria destes tem sido realizada em áreas com potencial petrolífero ou algum outro recurso mineral de importância econômica.

De acordo com suas feições estratigráficas, tectônicas, magmáticas, metamórficas e geomórficas próprias, o território brasileiro é diferenciado em 15 Províncias estruturais (BIZZI *et al.* 2003; Figura 2-10).

Os rios amostrados neste estudo fazem parte da Província Parnaíba (rios Tocantins, Turiaçu, Pindaré, Mearim, Itapecuru e Parnaíba). Esta, juntamente com as Províncias Amazonas e Paraná, constitui as três grandes bacias intracratônicas do Brasil que se tornaram definidas no Eocarbonífero (PETRI & FÚLFARO, 1983).

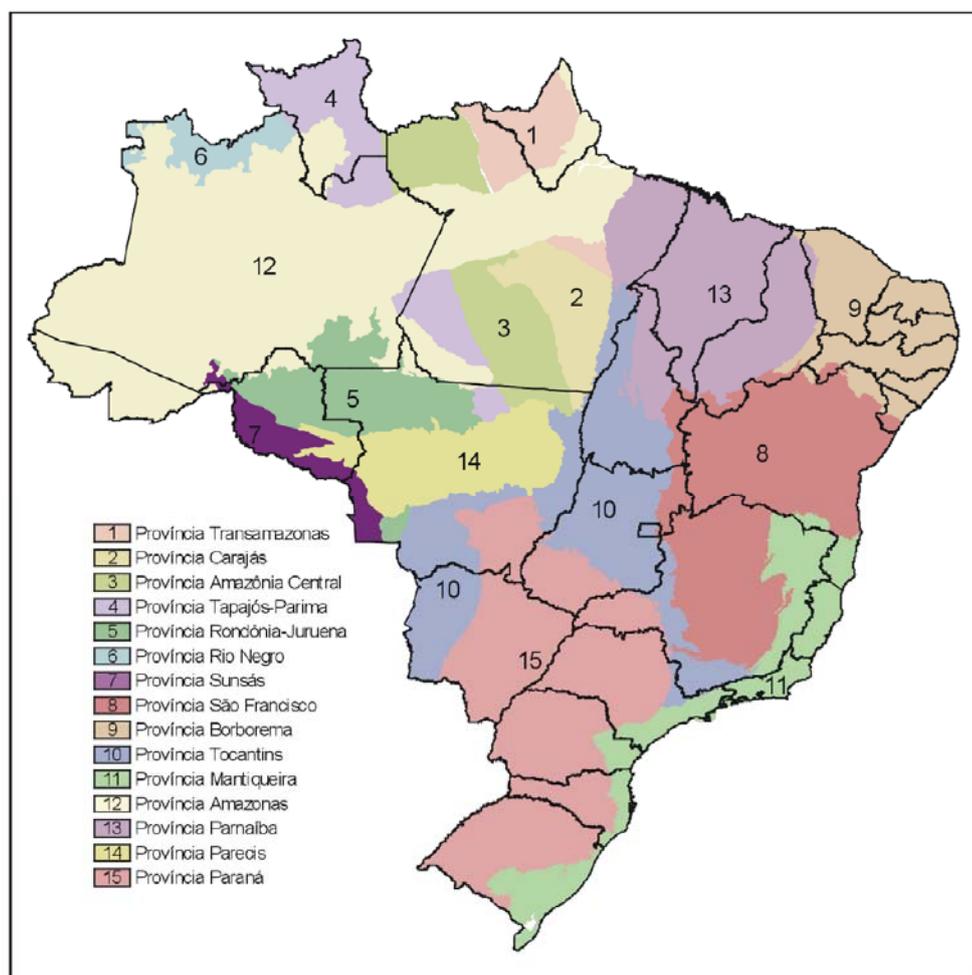


Figura 2-10. Províncias estruturais do Brasil. Fonte: Bizzi *et al.* (2003).

A Província Parnaíba abrange quase inteiramente os Estados do Piauí e Maranhão e partes adjacentes do Tocantins e do Ceará, separando-se das bacias do Amazonas e do Marajó, e das bacias costeiras de São Luís e Barreirinhas, por estruturas tectônicas (PETRI & FÚLFARO, 1983). A bacia é limitada a norte pelo Arco Ferrer (Arco São Vicente Ferrer – Urbano Santos – Guamá); a leste pela Falha de Tauá; a sudeste pelo Lineamento Senador Pompeu; a oeste pelo Lineamento Tocantins – Araguaia; e, a noroeste, pelo Arco Tocantins (SILVA *et al.* 2003). O Arco Ferrer – Urbano Santos a separa das fossas tectônicas de São Luís e Barreirinhas, com formação iniciada durante o processo de rifteamento mesozóico que originou estas bacias (VEIGA JR & OLIVEIRA, 2000). O Arco Tocantins

separa a Província Parnaíba da Fossa do Marajó e desenvolveu-se no Mesozóico, interrompendo uma ligação com a Bacia do Amazonas através da Bacia do Marajó estando, atualmente, em grande parte encoberto por sedimentos cenozóicos (PETRI & FÚLFARO, 1983). O substrato da bacia é composto por maciços arqueanos com idade superior a 2.500 Ma, crátons sinbrasilianos (ca. 600 Ma) e cinturões orogênicos brasilianos (ca. 550 Ma) sobre o qual implantaram-se estruturas grabeniformes no Mesoproterozóico (ca. 1.500 Ma), Neoproterozóico (ca. 900 Ma) e no Fanerozóico (Cambro-ordoviciano, ca. 500 Ma).

De acordo com Aguiar (1971 *apud* PETRI & FÚLFARO, 1983) a Província Parnaíba teria tido origem principalmente no desenvolvimento de dois eixos de subsidência: um a partir da área do Marajó, com direção sudeste, infletindo-se para leste a partir do centro do Estado do Maranhão; e outro, de rumo nordeste, passando por Floriano. Este, no lado sudoeste, vai-se infletindo, tendendo a tomar rumo sul; neste rumo deveria estabelecer-se a ligação com a bacia do Paraná no Devoniano, enquanto que o primeiro eixo faria a ligação com a bacia do Amazonas através do Marajó.

A história evolutiva da Província Parnaíba, sintetizada por Gomes (2001), teria sido controlada por cinco ciclos tectono-deposicionais separados por discordâncias regionais. O primeiro ciclo corresponde ao desenvolvimento do Grupo Serra Grande durante o Ordoviciano e o Siluriano; no segundo ciclo ocorreu o desenvolvimento do Grupo Canindé entre o Devoniano e o início do Carbonífero, marcado pela deposição dos clastos marinhos, litorâneos e continentais da Formação Poti; o terceiro, que durou até o Triássico, corresponde à deposição do Grupo Balsas em condições marinhas restritas, acompanhado de um processo de desertificação e de deslocamento dos depocentros para a parte central da bacia; o quarto ciclo foi marcado pela deposição do Grupo Mearim do Jurássico ao Eo-Cretáceo, influenciado pelos processos tectônicos e magmáticos associados à separação das placas sul-americana e africana; o último ciclo corresponde ao fechamento da bacia com a deposição das formações

Codó/Grajaú e Itapecuru por sedimentos lacustres e continentais que se estendem até o Recente.

Silva *et al.* (2003), baseados em Góes & Feijó (1994), propuseram a diferenciação da Província Parnaíba em quatro bacias tectonicamente distintas (Figura 2-11): bacia do Parnaíba propriamente dita, bacia das Alpercatas, bacia do Grajaú e bacia do Espigão-Mestre.

Estas bacias, embora pertencentes a um mesmo conjunto geológico, tiveram origem em períodos distintos com ambientes deposicionais característicos, resumidos a seguir de acordo com Silva *et al.* (2003).

A Bacia do Parnaíba, implantada sobre os riftes cambro-ordovicianos de Jaibaras, Jaguarapi, Cococi/Rio Jucá, São Julião e São Raimundo Nonato, teria se originado durante o Siluriano – Triássico, ocupando metade da Província em sua parte centro-sul. Durante sua evolução, as formações geológicas que a compõem foram depositadas em ambiente marinho/litorâneo, exceto as formações Motuca (lacustre/lagunar) e Sambaíba (eólico).

A bacia das Alpercatas, formada pelo assoreamento de rochas sedimentares e empilhamento de material vulcânico, evoluiu durante o Jurássico – Cretáceo e está situada na região centro-sudeste do Estado do Maranhão. É composta por um sistema de riftes de direções ENE-WSW e NNE-SSW e por formações geológicas interpretadas como de ambientes fluviais e/ou continentais.

A bacia do Grajaú, de origem cretácea, está localizada a norte da bacia das Alpercatas, separada da bacia de São Luís pelo Arco Ferrer – Urbano Santos, com depósitos associados a ambientes costeiros e, também, a deltas, marés e tempestades.

A bacia do Espigão-Mestre, originada durante o Cretáceo, apresenta-se discordante sobre a bacia do Parnaíba, correspondendo à extremidade norte da sub-bacia

Urucuaia, domínio setentrional da bacia Sanfranciscana que separa-se do Parnaíba pelo Alto do São Francisco.



Figura 2-11. Bacias sedimentares da Província Parnaíba. Fonte: Silva *et al.* (2003).

2.4.2 Evolução das drenagens

A história das espécies de peixes atuais que habitam os rios da América do Sul teve início com a compartimentação do Gondwana, como resultado da abertura do Atlântico Sul durante o Meso-Cenozóico (SCHOBENHAUS & NEVES, 2003). A partir desse

período, processos orogenéticos, subsidências e rifteamentos influenciaram o estabelecimento das bacias hidrográficas atuais (POTTER, 1997).

Apesar da idade antiga dos escudos sul-americanos e das bacias intracratônicas, o padrão de drenagem dos rios da região começou a ser estabelecido somente no Paleoceno (ca. 67 Ma) e concluído no final do Mioceno (ca. 8 Ma) com a elevação máxima da Cordilheira dos Andes (LUNDBERG *et al.*, 1998). Assim, para os peixes de água doce, o Mioceno foi um período particularmente importante, pois as mudanças tectônicas ocorridas na América do Sul, associadas às variações de nível do mar, influenciaram a dispersão e/ou o isolamento das espécies atuais a partir de suas bacias de origem.

As mudanças ocorridas na bacia Amazônica durante este período tiveram consequências sobre as bacias vizinhas, alterando a composição das comunidades e a distribuição geográfica das espécies de peixes. No início do Mioceno (ca. 25 Ma), o Rio Amazonas e o nordeste dos Andes ainda não estavam formados. A maioria dos cursos d'água existentes na época nascia na margem norte do escudo brasileiro e fluía em direção ao mar do Caribe através de uma passagem pelo atual delta do Orinoco (WESSELINGH & MACSOTAY, 2006). Com o soerguimento posterior da parte nordeste dos Andes (ca. 15 Ma), os fluxos dos rios foram invertidos formando um sistema flúvio-lacustre precursor do Rio Amazonas que, por sua vez, se tornou uma drenagem transcontinental no final do Mioceno (HOORN, 1993, 2006b; HOORN *et al.*, 1995; LUNDBERG *et al.*, 1998). Este evento também foi responsável pela geração de novos sistemas, tais como os dos rios Magdalena, Paraguai e Orinoco (POTTER, 1997).

O processo orogenético da Cordilheira dos Andes não exerceu influência apenas sobre a geologia das áreas adjacentes, mas também sobre toda a bacia Amazônica e as regiões a leste desta, onde se inclui a bacia sedimentar do Parnaíba (IBGE, 1984; PETRI & FÚLFARO, 1983).

Durante esse período, surgiu a paisagem atual dos chapadões e chapadas do território maranhense, com altitudes que variam de 800 metros na chapada das Mangabeiras a 300 metros na chapada de Tiracambu.

No Plioceno (ca. 5,3 a 1,7 Ma) teve início o Ciclo Velhas caracterizado por um aplainamento geral da superfície maranhense, mais intensa na região central, produzindo as depressões intermontanas dos altos cursos e as depressões periféricas no sopé das “cuestas”. A altitude máxima dessas superfícies chega a 300 metros nas depressões dos altos cursos dos rios e reduz progressivamente até algumas dezenas de metros para o norte, onde é recoberta pelos depósitos da Formação Barreiras (IBGE, 1984).

Durante o Pleistoceno (ca. 1,8 Ma a 0,12 Ma), a região esteve sujeita a uma epirogênese positiva como resultado de reativações tectônicas das falhas que deram origem ao Arco Férrer-Urbano Santos, exumando-se a superfície pré-cretácea modelada em rochas pré-cambrianas, principalmente na área dos remanescentes do cinturão do Gurupi (KLEIN *et al.*, 2005). Ainda nesse período ocorreu a formação do Golfão Maranhense e da Ilha de São Luís em decorrência dos movimentos eustáticos responsáveis pelas regressões e transgressões marinhas (PETRI & FÚLFARO, 1983).

Variações climáticas com alternância de períodos de baixa e alta umidade e alta e baixa temperatura influenciaram a dinâmica dos rios na região. Tais variações favoreceram, por exemplo, o desenvolvimento de processos de meteorização que caracterizam os altos cursos dos rios Pindaré, Mearim e Grajaú, onde seus vales apresentam-se encaixados e seus leitos divagantes sobre a planície aluvial (IBGE, 1984).

Como consequência dos processos climáticos e dos eventos geológicos descritos acima, os rios apresentam uma fraca declividade. Esta, associada à grande oscilação das marés na área do Golfão Maranhense, favorece a penetração da vaga até dezenas de quilômetros nos seus vales, reduzindo a velocidade da corrente fluvial e aumentando a

deposição de carga sólida com a formação de bancos de sedimentos, planícies aluviais e ilhas de pequena altitude (IBGE, 1984).

No litoral, os setores oriental e ocidental apresentam contrastes marcantes com relação à paisagem. No lado oriental, as fozes dos rios tendem a ser desviadas para noroeste sob influência das restingas presentes ao longo do litoral. O lado ocidental, por sua vez, corresponde a um antigo litoral de “rias”, com largos estuários elaborados após a transgressão Flandriana.

De modo geral, a drenagem de uma área é fortemente influenciada pela origem e reativação de falhas tectônicas. A importância destas sobre a definição dos cursos dos rios é exemplificada na região da Foz do Amazonas, onde um conjunto destas permaneceu ativo do Mesozóico até o final do Terciário e foram preenchidas por sedimento durante o Pleistoceno-Holoceno (COSTA *et al.*, 2001). Recentemente, Ribeiro (2006) fez uma revisão sobre o papel da atividade tectônica na determinação dos padrões biogeográficos de peixes das drenagens costeiras do leste do Brasil. De acordo com o autor, os eventos cladogenéticos entre elementos da ictiofauna de drenagens do escudo cristalino e do Atlântico teriam ocorrido como efeito da criação de megadomos, controladores dos cursos dos rios sobre o escudo cristalino, logo após a ruptura do Gondwana.

Do mesmo modo, na região nordeste do Pará, Costa *et al.* (1997) identificaram um conjunto de estruturas de idade Mioceno-Plioceno (ca. 5,3 Ma) formado por um compartimento transpressivo e outro transtensivo. O compartimento transpressivo ocupa a área entre as cidades de Marabá e Paragominas, estendendo-se para o oeste do Maranhão. O feixe norte deste compartimento tem extensão aproximada de 560 km entre os vales dos rios Mearim e Tocantins, produzindo anomalias em cotovelo nas drenagens de terceira ordem e exercendo forte controle na orientação das drenagens de primeira e segunda ordem (COSTA *et al.*, 1997). O feixe sul, por sua vez, ocorre por cerca de 350 km passando por Imperatriz e

Marabá sendo responsável pela forma em cotovelo no baixo curso dos rios Araguaia e Tocantins e manifestando-se na forma de serras alinhadas com altitude de até 500 metros, compondo a Serra do Tiracambu (COSTA *et al.*, 1997). Segundo os autores, na mesma época, falhas transcorrentes de direção NE-SW foram reativadas, passando a controlar as disposições do baixo curso do Rio Tocantins, da Baía de Marajó e a orientação geral do Rio Gurupi.

A identificação dessas estruturas neotectônicas sugere, portanto, que o Mioceno-Plioceno foi um momento importante para a individualização das drenagens maranhenses. Os eventos transpressivos, associados a um conjunto de falhas transcorrentes possibilitaram o desenvolvimento de áreas elevadas separando a drenagem do Maranhão (a leste da Serra do Tiracambu) do Tocantins.

O Rio Gurupi, por outro lado, situado a oeste da Serra do Tiracambu, pode ter permanecido em contato com afluentes do Tocantins ou do Rio Guamá por mais tempo. Isso é provável porque uma análise do relevo na margem oeste do Gurupi revela poucas formações elevadas da mesma idade que a serra do Tiracambu e que poderiam ter atuado como divisores de água. Esta hipótese encontra suporte no fato de que análises de sedimentos pós-Barreiras no curso inferior do Rio Tocantins, datados do Plio-Pleistoceno (ca. 2,5 Ma), sugerem que essa parte do rio formava um “delta” na altura de Tucuruí (ROSSETTI & VALERIANO, 2007). Posteriormente, no final do Pleistoceno (ca. 0,12 Ma), falhas no sentido NE-SW teriam capturado o curso inferior do rio Tocantins para formação da Baía de Marajó (VITAL & STATTEGGER, 2000; COSTA *et al.*, 2001, 2002).

Remodelagem do terreno por efeito de reativação de falhas também pode ter ocorrido no nordeste do Maranhão, onde um amplo conjunto de terreno terciário, pontuado por sedimentos quaternários, está presente. Nesta área, estão presentes vários rios menores com cursos mais ou menos paralelos no sentido WSW-NEE, provavelmente influenciados

pelas estruturas do Arco Urbano Santos, erodido durante o Terciário (VEIGA JUNIOR & OLIVEIRA, 2000).

Costa *et al.* (1997) também identificaram que a estruturação do Quaternário para a região noroeste do Maranhão corresponde a uma bacia de tipo de afastamento, controlada por falhas transcorrentes E-W nas bordas norte e sul, e por falhas normais NW-SE nas bordas nordeste e sudoeste. A reativação das falhas E-W exerceu influência principalmente sobre pequenos rios costeiros localizados entre as bocas dos rios Turiaçu e Pericumã. Estas falhas induziram a captura de segmentos de rios, mudando suas direções de NE-SW para E-W, e bloquearam a drenagem formando o sistema de lagos característicos nas regiões dos municípios de Monção, Penalva e Viana. As falhas normais NW-SE foram responsáveis principalmente pelo bloqueio de parte da drenagem, formando os lagos observados nos rios Turiaçu (em Santa Helena) e Pericumã (em Pinheiro).

2.5 Variações no nível do mar e mudanças climáticas

Incursão marinha é um termo utilizado pela Geologia em referência à invasão do continente pelas águas do mar como consequência das variações de nível deste durante os períodos geológicos da Terra. Vários processos têm sido reclamados como responsáveis pelos movimentos eustáticos, tais como, glaciação, mudança de temperatura da água do mar, sedimentação, subsidência de bacias e ajustes isostáticos da crosta suboceânica em resposta a mudanças na espessura do oceano (FLINT, 1957; PETRI & FÚLFARO, 1983; SILVA *et al.* 1999; COSTA *et al.* 2001).

Evidências de incursões marinhas ao longo do passado geológico da Terra são fornecidas para várias partes do mundo (WOODROFFE, 1995; OSKIN & STOCK, 2003; MARRINER *et al.*, 2007; WHITEHOUSE *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2008). Na América do Sul, incursões marinhas foram relatadas para todo o continente, influenciando a evolução

da biota neotropical (ROSSETTI, 2000; NORES, 2004; HOORN, 2006a; LOVEJOY *et al.*, 2006).

Para a área de estudo há pouca informação disponível sobre a influência marinha ao longo do tempo geológico. Entretanto, uma vez que as mudanças no nível do mar são eustáticas, ou seja, afetam o mar como um todo (FLINT, 1957; FAIRBRIDGE, 1961), as informações disponíveis para regiões próximas, tais como, estuário amazônico e nordeste do Brasil podem, de certa forma, serem utilizadas para composição do cenário hidrológico dos rios maranhenses sob influência das transgressões/regressões marinhas. Por exemplo, Rossetti (2000, 2001) observou similaridades em termos de idade, litologia e arquitetura das fácies entre áreas da plataforma Bragantina e da Bacia São Luís, apesar de estarem separadas por mais de 1000 km de distância.

Para melhor visualização e interpretação dos efeitos das incursões marinhas sobre as possíveis vias de dispersão para peixes de água doce, as transgressões postuladas para uma determinada época foram simuladas utilizando a base de dados HydroSHEDS (LEHNER *et al.*, 2006). É importante lembrar que as simulações representam apenas uma aproximação do que pode ter acontecido no passado, levando em consideração a topografia atual. Por outro lado, se considerarmos que a drenagem moderna foi estabelecida no final do Terciário (LUNDBERG *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2001), a margem de erro das simulações será reduzida, indicando situações reais no passado.

Entre o final do Oligoceno e início do Mioceno o nível do mar estava a cerca de 40-50 m acima do nível atual (FERREIRA *et al.*, 1984). Devido ao relevo extremamente baixo da moderna Plataforma Bragantina, essa transgressão foi suficiente para cobrir toda a área, tal como indicado pela deposição de uma mistura de carbonato e siliclástico (ROSSETTI, 2001). Análises das sequências deposicionais indicam que o nível do mar continuou a subir lentamente, com eventuais quedas durante o início-médio Mioceno,

produzindo um padrão de deposição nas sequências muito similar ao observado na Bacia São Luís (ROSSETTI, 2000, 2001). De acordo com a autora, o Mioceno médio nestas áreas foi caracterizado por um período de eventos de baixa amplitude/alta frequência que, sobrepostos à transgressão global permitiram o desenvolvimento dos sistemas estuarinos ao longo da costa norte do Brasil.

Estes eventos foram importantes na modelagem da paisagem, pois geralmente estão associados à progradações dos estuários em direção ao mar, eventualmente sendo preenchidos completamente e convertidos em um delta e planície aluvial (ROSSETTI, 2000). Segundo a autora, este último estágio nunca foi atingido na Bacia São Luís, uma vez que as condições estuarinas permaneceram durante todo o período de deposição.

O mar regrediu no final do Mioceno, mas um clima tropical com estações secas bem definidas prevaleceu nesse período, tal como indicado pela abundância de perfis ferricrete (ROSSETTI, 2001). Esta condição, na verdade, continuava desde o Mioceno médio quando a migração sazonal da Zona de Convergência Intertropical (ITCZ) era comparável à atual, sendo a precipitação o principal regulador do clima da Amazônia nesse período (KAANDORP *et al.*, 2005). Posteriormente, implantaram-se as características de clima seco, típicas das glaciações Pleisto-Holocênicas.

Rossetti (2001) sugere que os eventos tectônicos regionais que contribuíram para as mudanças no nível do mar foram: a) divisão da Placa Farallon nas placas Nazca e Cocos e consequente orogênese da Cordilheira dos Andes; e b) formação do Istmo do Panamá, encerrando a comunicação entre o Atlântico e o Pacífico.

Ao passo que no início do Mioceno o nível do mar estava em cerca de 40-50 m acima do nível atual (FERREIRA *et al.*, 1984), as curvas eustáticas de Haq *et al.* (1987) indicam que por volta do Mioceno médio o nível do mar pode ter atingido a cota de 150 m acima do nível atual. Nessas condições, a maioria das drenagens da área de estudo estaria

inundada, com apenas as partes altas dos rios preservadas (Figura 2-12). No final do Mioceno-Plioceno inferior (ca. 5 Ma), quando as drenagens atuais tomavam sua configuração atual (LUNDBERG *et al.*, 1998), foram estimadas transgressões periódicas em torno de 100 m, com duração aproximada de 800.000 anos (NORES, 2004). Nessa cota, as drenagens ainda estariam sob influência marinha até o trecho médio, com a cabeceira do rio Turiaçu ficando descoberta, após um longo período de submersão (Figura 2-12).

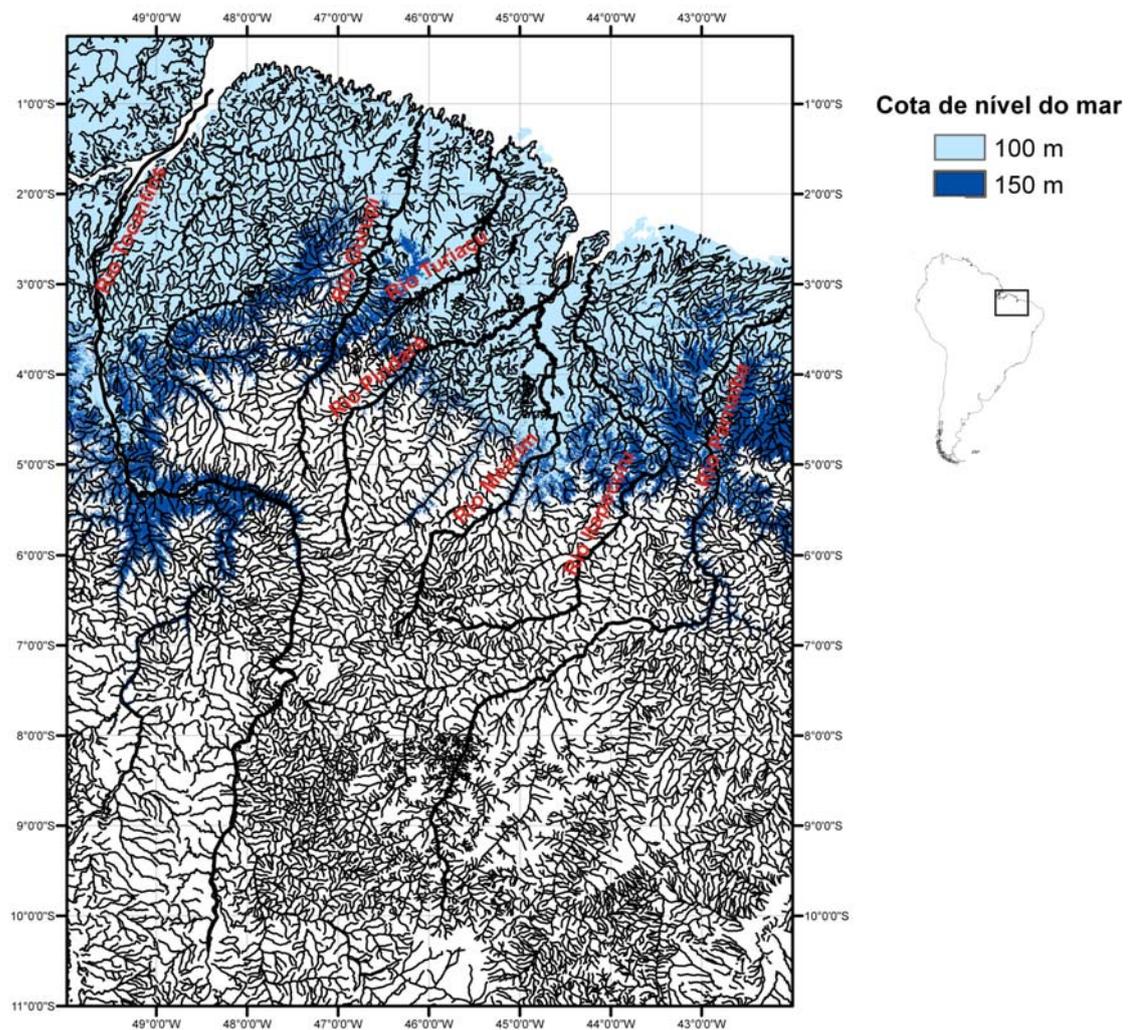


Figura 2-12. Provável distribuição da linha de costa durante o Mioceno nas regiões hidrográficas Tocantins, Nordeste Ocidental e Parnaíba.

O Plioceno foi marcado por mudanças globais significativas, caracterizado por tendência geral para condições de aridez e clima frio (CROWLEY & NORTH, 1991).

Durante este período ocorreu elevação do Istmo do Panamá (WEBB & RANCY, 1996), expansão das savanas em substituição das florestas (VAN DER HAMMEN & HOOGHMSTRA, 2000) e a mudança de um sistema lacustre para um sistema fluvial na Amazônia (ROSSETTI *et al.*, 2005).

Entre o Plioceno médio e inferior (5-2,5 Ma) predominou clima quente nas regiões equatorial e extratropical (MOLNAR & CANE, 2002) seguindo-se, posteriormente, por períodos frios recorrentes que culminaram com a formação da atual calota Antártica no final do Plioceno (BARRET *et al.*, 1992; SHACKLETON & OPDYKE, 1997).

Por volta do Plioceno médio (~3 Ma) a Terra passou por um período quente em que as temperaturas superficiais do Atlântico Norte eram cerca de 8 °C mais altas do que as registradas atualmente (DOWSETT *et al.*, 1992). Essa idade coincide com um nível do mar na cota de 50 m acima do nível atual (HAQ *et al.*, 1987), inundando completamente os cursos baixos das maiores drenagens da área de estudo (Figura 2-13).

O Pleistoceno parece ter iniciado com clima quente e úmido, tal como sugerido para várias partes do mundo (CLARK, 1996; HOWARD, 1997; ZÁRATE & FASANA, 1989). O mar sofreu regressões graduais, de modo que entre o Pleistoceno médio e superior (ca. 0,78 Ma) ele estava cerca de 10 a 14 m acima do nível atual (VILLWOCK *et al.*, 1986; BARRETO *et al.*, 2002). Períodos úmidos foram alternados com períodos secos, tendo-se encontrado registros de glaciações no mundo inteiro nas diferentes fases do Pleistoceno (EHLERS & GIBBARD, 2008), com o último máximo glacial atingido a cerca de 18 Ka (0,18 Ma) quando o mar regrediu para 120 m abaixo do nível atual (THOMAS & THORP, 1995; BEHLING, 2002).

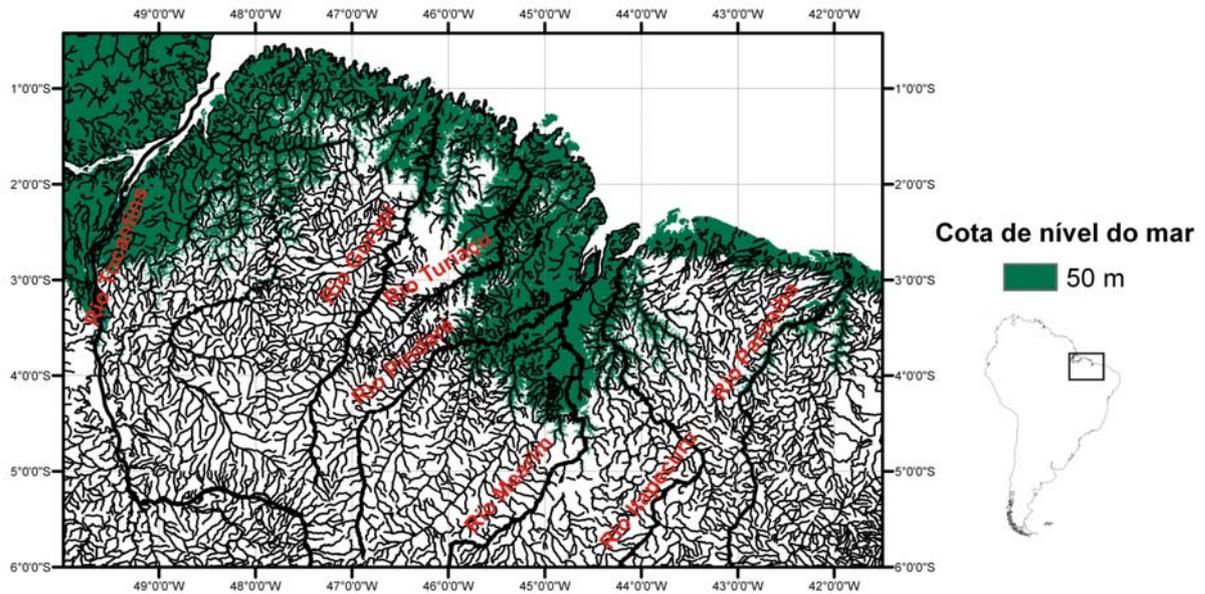


Figura 2-13. Provável distribuição da linha de costa durante o Plioceno nas regiões hidrográficas Tocantins, Nordeste Ocidental e Parnaíba.

Na Lagoa do Caçó, cerca de 130 km a leste de São Luís-Ma, Ledru *et al.* (2001) associaram o aumento no registro de pólenes de *Podocarpus* entre 13 e 12,5 Ka a condições frias e úmidas. Com base nesses registros e na ampla distribuição de *Podocarpus* em sítios amazônicos, os autores inferiram uma expansão regional da floresta e, dessa forma, a manutenção de condições climáticas úmida e fria na Amazônia durante o último máximo glacial.

As características climáticas e os movimentos do mar registrados para o Pleistoceno sugerem que, durante esse período, os principais rios estariam com seus cursos baixos submersos (Figura 2-14). Entretanto, ao contrário do Plioceno, os rios Itapecuru e Parnaíba seriam os menos afetados pelas transgressões, pois apenas uma pequena parte dos cursos inferiores destes teria ficado sob influência marinha.

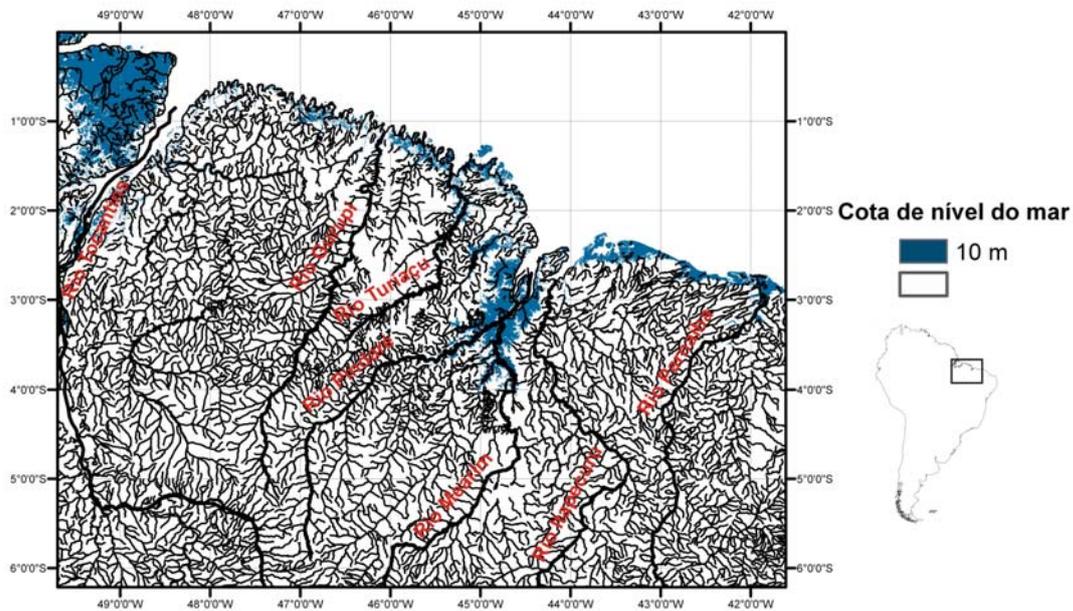


Figura 2-14. Provável distribuição da linha de costa durante o Pleistoceno nas regiões hidrográficas Tocantins, Nordeste Ocidental e Parnaíba.

As flutuações marinhas do Plioceno e Pleistoceno exerceram um papel importante na evolução geomorfológica do Golfão Maranhense, onde estão localizadas as desembocaduras dos rios da região central do Estado. A evolução do Golfão teve início com o soerguimento da faixa litorânea durante o Plioceno, implicando em superimposição da rede de drenagem e erosão da Formação Barreiras, seguido por um novo soerguimento com retomada de erosão e aprofundamento dos vales a um nível mais inferior (AB’SABER, 1960). A regressão pleistocênica reconfigurou as baías de São Marcos e São José e promoveram o surgimento da Ilha do Maranhão (ou Ilha de São Luís), deixando como testemunho no continente a planície flúvio-marinha de Perizes. Um novo soerguimento no final do Pleistoceno, embora de menor intensidade e acompanhado de moderada transgressão marinha, deu a configuração atual da morfologia do Golfão Maranhense (AB’SABER, 1960).

No início do Holoceno (~10 – 9 Ka) o mar estava próximo do nível atual e permaneceu assim até por volta de 5,5 Ka quando ocorreu a transgressão máxima do período, elevando o nível do mar até 4 – 5 m (BEHLING & COSTA, 2001). Entretanto, no Lago do

Aquiri, região da Baixada Maranhense, a ocorrência de microforaminíferos e dos gêneros *Rizophora* e *Avicennia* indicam que o Atlântico estendia-se continente adentro, com a linha de costa localizada mais internamente (BEHLING & COSTA, 1997). O mesmo parece ter ocorrido no nordeste do Pará onde análises dos sedimentos da Lagoa da Curuça, Lago Crispim e Taperebal indicaram a presença de formações de manguezais com idades próximas àquelas do Lago do Aquiri (BEHLING, 2002; VEDEL *et al.*, 2006).

Durante o início do Holoceno, a insolação de verão atingiu seus valores mais baixos no hemisfério sul com verões mais quentes, invernos mais frios e precipitação menor do que os dias atuais (MARTIN *et al.*, 1997). Entre 9 – 4 Ka, os fósseis da Lagoa do Caçó indicam expansão do Cerrado com predominância de clima seco, culminando com a instalação definitiva de sua composição florística atual (PESSENDA *et al.*, 2004; LEDRU *et al.*, 2006).

As transgressões holocênicas, mais fracas do que às dos períodos anteriores, aparentemente não teriam tido força suficiente para inundar as planícies de inundação ficando restritas aos talwegues dos rios e influenciando as drenagens do Maranhão de diferentes formas. Um aumento de 5 m no nível do mar seria suficiente para que esse adentrasse o Rio Tocantins até próximo de Tucuruí; no Rio Turiaçu quase a totalidade do curso médio-inferior teria sido inundado; no Golfão Maranhense, apenas Pindaré e Mearim seriam os mais atingidos, com água marinha chegando ao Lago de Viana (Rio Pindaré) e Lago Açú (Rio Mearim); no Rio Parnaíba, apenas a parte baixa, correspondente à região do Delta seria atingida (Figura 2-15).

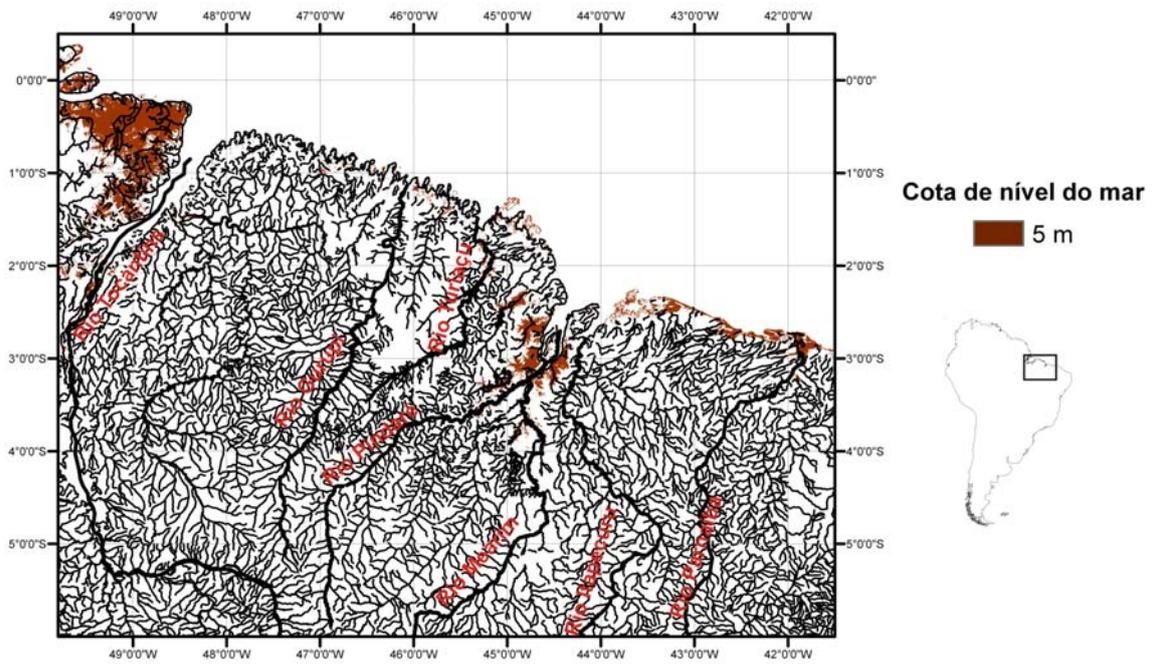


Figura 2-15. Provável distribuição da linha de costa durante o Holoceno nas regiões hidrográficas Tocantins, Nordeste Ocidental e Parnaíba.

3 VARIAÇÃO GEOGRÁFICA EM *HOPLIAS MALABARICUS* (BLOCH, 1794) (CHARACIFORMES: ERYTHRINIDAE) DO NORDESTE DO BRASIL

3.1 Introdução

Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) é uma espécie de água doce com ampla distribuição pela América do Sul. Devido à sua grande variação, tanto em caracteres morfológicos quanto genéticos, é geralmente considerada um complexo de espécies (BERTOLLO *et al.*, 2000; OYAKAWA, 2003; ROSA *et al.*, 2009). Estudos citogenéticos têm permitido identificar sete citótipos macroestruturais na América do Sul, com variações entre eles representando novas combinações cromossômicas (BERTOLLO *et al.*, 2000; BORN & BERTOLLO, 2001). Além disso, análises combinadas de DNA e cariótipos têm revelado pequenas variações entre populações que compartilham um mesmo citótipo macroestrutural (DERGAM *et al.*, 2002; VICARI *et al.*, 2005, 2006). Em algumas áreas do sudeste do Brasil a variação é tão evidente que foi sugerido a fragmentação de *H. malabaricus* em, pelo menos, duas espécies distintas (DERGAM *et al.* 1998).

Nos rios do Estado do Maranhão, populações de *H. malabaricus* são definidas por um citótipo compartilhado com Suriname, Tocantins, cabeceiras do São Francisco e que faz parte de um grupo de citótipos amazônicos (BERTOLLO *et al.*, 2000). O padrão morfológico observado nessas populações segue aquele definido para a espécie com pequenas diferenças em relação aos indivíduos do Tocantins, onde é comum a contagem de um maior número de escamas na linha lateral (SANTOS *et al.*, 2004; PIORSKI *et al.*, 2007).

Um exame recente da distribuição dos Characiformes sugeriu duas áreas de endemismo (AE) envolvendo rios do Estado do Maranhão: AE Maranhão e AE Parnaíba (HUBERT & RENNO 2006). A AE Maranhão compreende os rios genuinamente maranhenses e o Rio Capim no Estado do Pará. A AE Parnaíba inclui o Rio Parnaíba e os rios

localizados ao norte da drenagem do Rio São Francisco, no nordeste do Brasil. Além disso, os autores observaram que apenas duas espécies de Characiformes são endêmicas da AE Maranhão, contrastando com mais de 40 espécies listadas para a AE Parnaíba.

Novos estudos envolvendo a ictiofauna da região localizada entre os rios Parnaíba e Tocantins tem revelado outras espécies endêmicas, tais como, *Brachyhalcinus parnaibae* Reis 1989, *Rhamphichthys atlanticus* Triques 1999, *Auchenipterus menezesi* Ferraris Jr & Vari 1999, *Roeboides sazimai* Lucena 2007 and *Platydoras brachylecis* Piorski, Garavello, Arce H & Pérez 2008. Estas espécies são citadas para as AEs Maranhão e Parnaíba, sugerindo que estas correspondem a uma única área de endemismo para os peixes neotropicais.

Estudos recentes de várias populações de peixes de drenagens maranhenses têm revelado variações morfométricas, associadas com o rio de origem. *Acestrorhynchus lacustris* do Rio Turiaçu, por exemplo, foi diferenciado das populações dos rios Grande e Mearim através de análise das variáveis canônicas (PIORSKI, dados não publicados). O mesmo padrão morfométrico foi detectado quando populações do Parnaíba, Turiaçu e Mearim foram comparadas, como no caso de *Loricaria cataphracta* (PIORSKI & CARVALHO-COSTA, *em preparo*), *Bryconops affinis* e *Hypostomus plecostomus* (PIORSKI, *dados não publicados*).

Uma vez que há possibilidades de variação entre populações onde apenas um citótipo foi reconhecido e dado os indícios de variação entre populações de peixes da AE Maranhão, nós examinamos a variação geográfica de *H. malabaricus* usando técnicas de morfometria geométrica e avaliamos se o padrão destacado por esta análise é repetido em sequências da região controle do DNA mitocondrial.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Análise genética

Amostras de tecidos de 64 indivíduos de *H. malabaricus* foram coletadas a partir de pedaços de nadadeiras e preservadas em etanol absoluto. Os exemplares utilizados eram procedentes de 13 localidades ao longo dos rios Parnaíba, Munim, Itapecuru, Mearim, Pindaré, Turiaçu e Tocantins (Figura 3-1). Material de referência, quando disponível, foi depositado na Coleção de Peixes do Departamento de Oceanografia e Limnologia (CPDOL) da Universidade Federal do Maranhão.

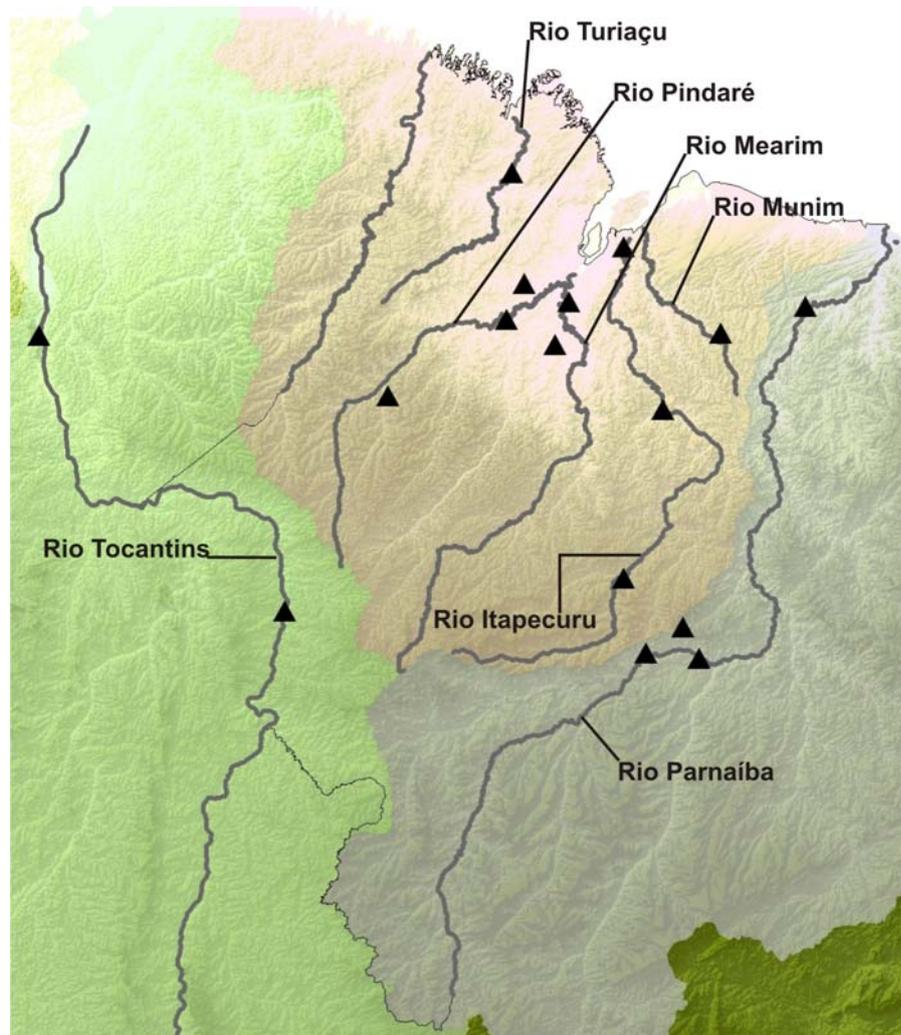


Figura 3-1. Locais de amostragem de tecidos nas regiões hidrográficas do Tocantins, Parnaíba e Atlântico Nordeste Ocidental.

O DNA genômico foi extraído usando uma modificação do método do tampão salino, descrito por Aljanabi & Martinez (1997). Em seguida, um fragmento de cerca de 750 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (DNAm_t) foi amplificado através de PCR usando os primers DLOOP-L (CRONIN *et al.*, 1993) e H16498 (KOCHER *et al.*, 1989). O mix para a reação de PCR foi preparado para um volume final de 30 µl contendo solução tampão fornecida com o kit, 2 mM de MgCl₂, 100 µM de dNTP mix, 0.4 µM de cada primer, 1.5 unidades de Taq Polymerase e 50 ng de DNA. As condições de PCR para amplificação do fragmento foram as seguintes: 35 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 52°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos com um incubamento inicial a 94°C por 2 minutos e extensão final a 72°C durante 5 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%, purificados usando o kit PurelinkTM PCR Purification (Invitrogen) ou GFX PCR (GE Healthcare), e sequenciados em um sequenciador automático MegaBase.

As sequências foram alinhadas usando o programa ClustalX 2.0.3 (THOMPSON *et al.*, 1997) e a qualidade do alinhamento inspecionada visualmente. O número de haplótipos e os índices básicos de diversidade genética foram obtidos com o pacote Arlequin 3.1.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Foram calculados a diversidade haplotípica (H), a diversidade nucleotídica (π), o número de sítios polimórficos e o número de sítios privados. A hipótese nula de neutralidade seletiva das sequências da região controle foi testada usando os testes D (TAJIMA, 1989) e Fs (FU, 1997). Desvios significantes nestes testes podem ocorrer em situações de expansão populacional recente ou efeito gargalo, onde nenhuma vantagem seletiva entre os haplótipos existe (RAND, 1996).

Uma rede de haplótipos foi gerada pelo método de parcimônia estatística no programa TCS 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000) estabelecendo um critério de parcimônia de 95% (TEMPLETON, 1998). Árvores haplotípicas foram obtidas pelos métodos de agrupamento de vizinhos (*Neighbor Joining*-NJ) no programa MEGA versão 4 (TAMURA *et*

al., 2007) e máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood-ML*) no Treefinder (JOBBER, 2008). O modelo de evolução molecular mais apropriado para o conjunto de dados para estimar a topologia ML foi encontrado com auxílio do programa jModelTest (POSADA, 2008). As árvores não foram enraizadas, mas são apresentadas com raiz no ponto médio.

A distribuição da variação genética entre as localidades amostradas foi avaliada aplicando-se uma AMOVA ao conjunto de dados usando o programa Arlequin 3.1.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Uma análise dos cladogramas aninhados (*Nested Clade Analysis -NCA*) foi realizada com base na rede de haplótipos usando o GEODIS 2.5 (POSADA *et al.*, 2000) para identificar os processos naturais responsáveis pelas variações genéticas detectadas entre as populações.

3.2.2 Análise morfométrica

Dados morfométricos foram obtidos a partir de 80 indivíduos usando ferramentas de morfometria geométrica. Espécimes de *H. malabaricus* foram fotografados individualmente e 17 marcos anatômicos (MA) foram digitalizados usando o programa tpsDig 2.12 (ROHLF, 2008). Os marcos anatômicos foram selecionados de tal modo que permitisse a captura da forma global do corpo com o menor número possível de variáveis.

No corpo do animal, os marcos foram posicionados utilizando-se um sistema de linhas em que pontos fixos foram definidos na superfície do corpo (MAs 1, 3, 7, 11 e 14) e pontos derivados a partir do cruzamento de linhas conectando dois MAs (Figura 3-2). Por exemplo, os MAs 5 e 6 resultam de uma linha vertical traçada sobre o ponto de interseção entre as linhas conectando os MAs 1 – 4 e MAs 2 – 3 (Figura 3-2).

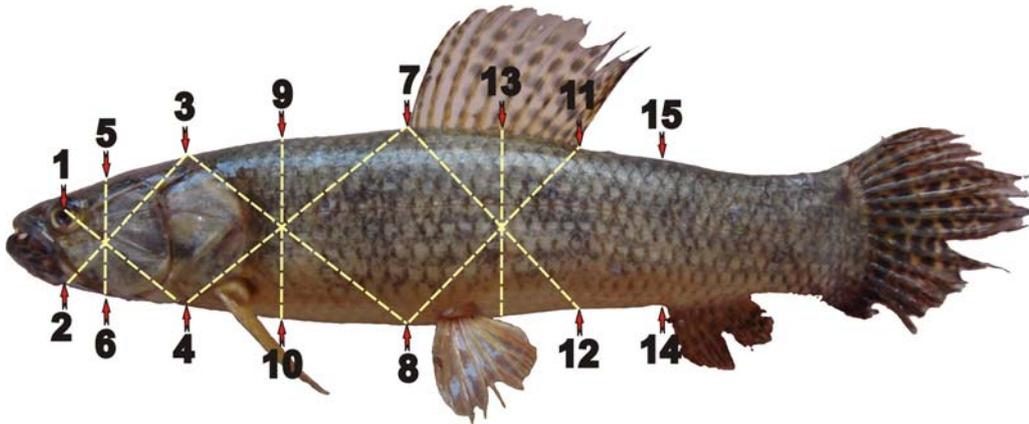


Figura 3-2. Marcos anatômicos definidos sobre o corpo de *Hoplias malabaricus*. Veja texto para descrição dos pontos.

O arquivo contendo as coordenadas dos marcos anatômicos foram submetidos a uma análise das deformações relativas (*Relative Warps Analysis* - RWA) usando o programa tpsRelw 1.45 (ROHLF, 2007a). Este procedimento avalia pequenas diferenças na forma do corpo entre os indivíduos em comparação (BOOKSTEIN, 1991). O primeiro passo da análise é produzir um alinhamento das imagens individuais para reduzir os efeitos de tamanho e distorção que possam ter ocorrido durante a digitalização. Esse passo foi realizado tal como descrito por Rohlf *et al.* (1996). O alinhamento é baseado em um procedimento de quadrados mínimos ortogonal generalizado (Procrustes) (ROHLF & SLICE, 1990) que superpõe as configurações individuais visando obter uma configuração de referência. Durante este procedimento é calculada a menor distância entre duas configurações (distância Procrustes). Esta, por sua vez, pode ser utilizada em vários delineamentos experimentais de análise de variância (MONTEIRO & REIS, 1999). Em seguida, os componentes localizados da mudança na forma foram calculados a partir da matriz de energia (*bending energy matrix* - W), cujos elementos são funções de distâncias entre dois marcos na configuração de consenso.

A matriz W , contendo os escores das deformações parciais, foi utilizada em uma análise das variáveis canônicas (AVC) para avaliar as diferenças na forma geométrica entre as populações. Cada indivíduo foi projetado sobre os vetores canônicos através de uma

regressão dos escores das deformações parciais sobre cada um dos eixos canônicos utilizando o programa tpsRegr 1.34 (ROHLF, 2007b). Este procedimento permitiu visualizar as mudanças na forma associadas a cada eixo canônico.

3.3 Resultados

3.3.1 Diferenciação genética

A análise de 64 sequências de DNA permitiu a identificação de 25 haplótipos definidos por 140 sítios segregantes. O modelo de evolução molecular que melhor se ajustou ao conjunto de dados, tal como sugerido pelo jModelTest (POSADA, 2008), foi o HKY+G com a razão transição/transversão = 2.46:1.

A variação genética, considerando-se todos os sítios amostrados, foi alta (diversidade haplotípica, $H = 0,93$; diversidade nucleotídica, $\pi = 0,095$). Os menores valores de H e π foram obtidos para as populações do Parnaíba e Itapecuru, ao passo que os maiores valores para esses parâmetros foram calculados para o Turiaçu (Tabela 3-1). Nesta localidade foi observado o maior número de sítios privados, enquanto que nas demais áreas este número variou de 0 a 2. Os estimadores de diversidade theta seguiram os mesmos padrões dos estimadores anteriores. A hipótese de neutralidade do marcador, avaliada pelo D de Tajima e F_s de Fu, não foi rejeitada quando calculada individualmente para cada população e nem quando as populações foram consideradas como um único grupo. Isso significa que as topologias das árvores são restringidas apenas por mutações e deriva aleatória, de modo que a demografia das populações pode ser inferida diretamente da genealogia (RAND, 1996).

Tabela 3-1. Características moleculares das populações de *Hoplias malabaricus*.

	Parnaíba	Munim	Itapecuru	Mearim	Pindaré	Turiaçu	Tocantins	Total
Indivíduos	12	2	10	10	19	9	2	64
Haplótipos	5	1	4	5	8	6	1	25
Theta S	38,41 ± 15,04	-	42,31 ± 17,88	41,71 ± 17,12	34,33 ± 12,02	49,67 ± 20,93	-	30,34 ± 8,35
Theta pi	47,88 ± 25,15	-	56,61 ± 30,72	61,07 ± 32,64	60,12 ± 30,36	69,06 ± 37,38	-	60,31 ± 29,27
H (div. haplotípica)	0,79 ± 0,09	-	0,78 ± 0,11	0,82 ± 0,09	0,84 ± 0,06	0,89 ± 0,09	-	0,93 ± 0,02
Π (div. nucleotídica)	0,076 ± 0,04	-	0,089 ± 0,05	0,096 ± 0,05	0,095 ± 0,05	0,11 ± 0,06	-	0,095 ± 0,05
D de Tajima	3,13	-	1,75	2,26	2,13	1,99	-	3,44
P(D)	1,00	-	0,99	0,99	0,99	0,99	-	1,00
Fu's Fs	25,76	-	13,13	11,91	11,53	7,62	-	15,34
P (Fs)	1,00	-	1,00	0,99	1,00	0,99	-	0,99

A divergência entre as populações, avaliada pelo número médio de diferenças par a par, variou de 0,3% a 23,78%, enquanto que a divergência intrapopulacional variou de 0% a 15,73% (

Tabela 3-2).

Tabela 3-2. Divergência genética par a par entre as populações de *Hoplias malabaricus* com base em seqüências da região controle do DNAm. Valores acima da diagonal são diferenças entre grupos. Valores na diagonal são diferenças dentro dos grupos.

	Parnaíba	Itapecuru	Mearim	Pindaré	Turiaçu	Tocantins	Munim
Parnaíba	0,0995	0,1548	0,0628	0,0835	0,1055	0,2378	0,2318
Itapecuru		0,1573	0,1388	0,1317	0,1446	0,087	0,0861
Mearim			0,1226	0,1035	0,1224	0,1853	0,1808
Pindaré				0,1297	0,1260	0,1614	0,158
Turiaçu					0,1511	0,1638	0,1603
Tocantins						0,00	0,0032
Munim							0,00

A análise de parcimônia estatística (APE) revelou que a amostra era composta por duas redes de haplótipos interconectadas. Em uma destas, o haplótipo H11 foi o mais frequente, compartilhado pelas populações do Parnaíba, Pindaré e Mearim (Figura 3-3). Os demais haplótipos ficaram restritos às suas localidades, que exceção de H20, presente nos rios

Itapecuru e Parnaíba. Os haplótipos do Rio Turiaçu (H2, H3, H6 and H7) foram situados como mais distantes em relação aos demais (Figura 3-3).

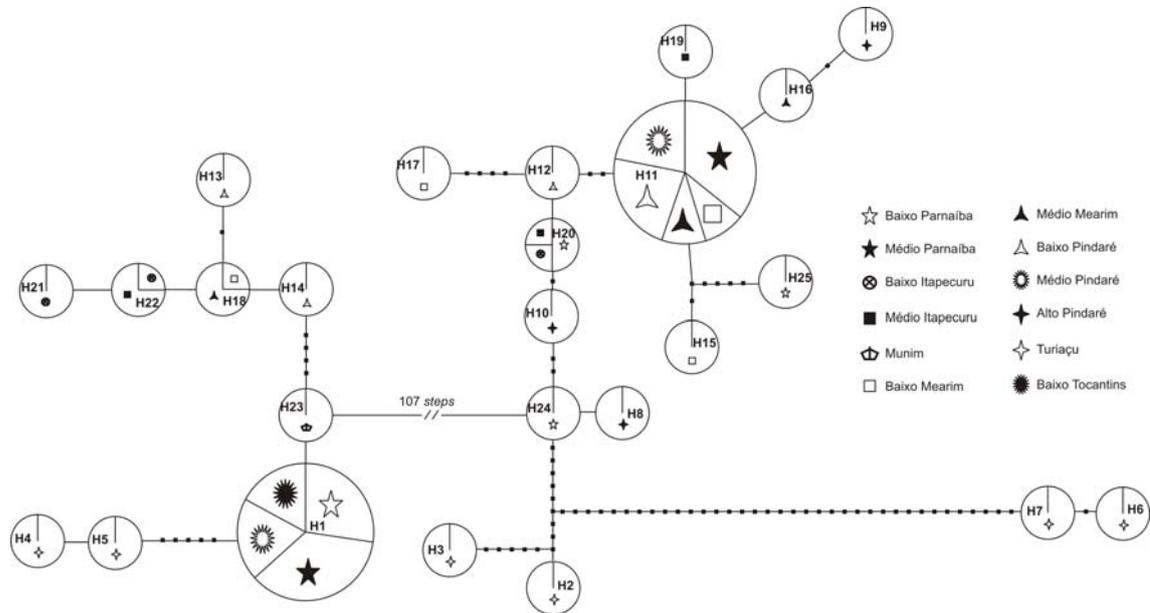


Figura 3-3. Rede de haplótipos das populações de *Hoplias malabaricus*, gerada pelo método de Parcimônia Estatística aplicado sobre um conjunto de sequências da região controle do DNAm.

Na segunda rede de haplótipos, H1 foi o mais frequente, compartilhado por Parnaíba, Pindaré e Tocantins. Os demais haplótipos ficaram restritos às suas bacias. H4 e H5 do Rio Turiaçu foram os mais divergentes quando comparados com os demais membros da rede (Figura 3-3).

A configuração observada na APE foi repetida nas topologias produzidas pelos métodos de Agrupamento de Vizinhos e Máxima Verossimilhança. Nestas, os clados H1 e H11 foram bem suportados por valores de bootstrap (Figura 3-4).

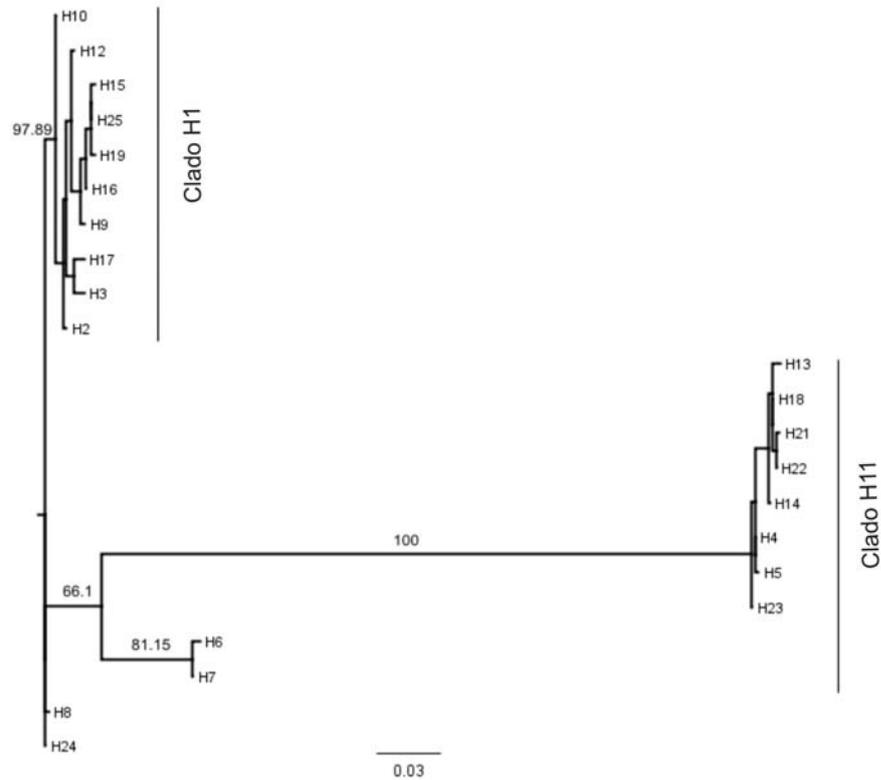


Figura 3-4. Árvore haplotípica obtida pelos métodos Agrupamento de Vizinhos e Máxima Verossimilhança. Apenas valores de bootstrap maiores do que 50% são mostrados sobre os ramos.

A análise dos clados aninhados (NCA) detectou associação geográfica em vários níveis de agrupamento, mas foi incapaz de produzir algum resultado conclusivo no maior nível de agrupamento, representando o cladograma total (Figura 3-5, Tabela 3-3). Entretanto, fragmentação alopátrica e fluxo gênico restrito com isolamento por distância foram os processos evolutivos sugeridos nos níveis inferiores de agrupamento.

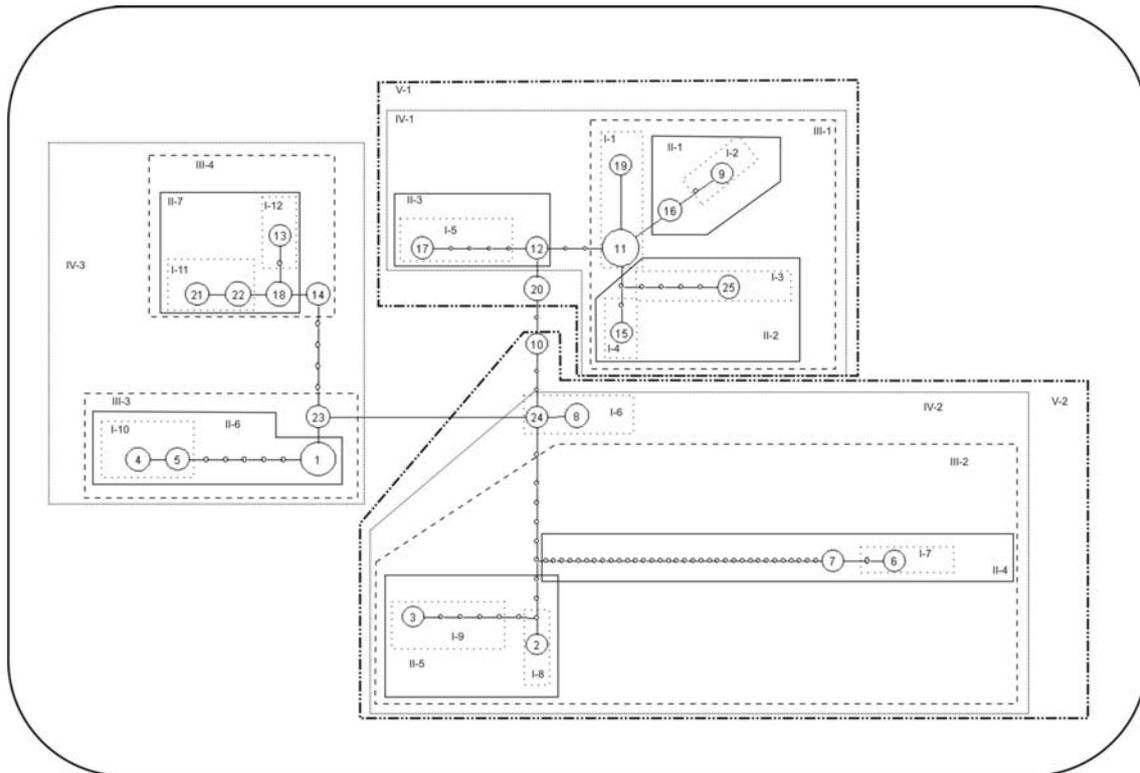


Figura 3-5. Rede de máxima parcimônia para os haplótipos de *Hoplias malabaricus*, obtidos com base em sequências da região controle do DNAmT, e a configuração utilizada para a análise dos cladogramas aninhados (NCA). Cada linha na rede representa uma mudança em um passo mutacional. Um círculo indica um nó interno que não estava presente na amostra.

Tabela 3-3. Clados com associação geográfica significativa produzidos pela NCA para as sequências do DNAmT de *Hoplias malabaricus*.

Clado	χ^2_{obs}	$p(\chi^2_{rand} \geq \chi^2_{obs})$	Inferência NCA
II – 6	16,00	0,00	fragmentação alopátrica
II – 7	22,00	0,00	fragmentação alopátrica
III – 1	21,68	0,03	fluxo gênico restrito com isolamento por distância
III – 3	18,00	0,02	fragmentação alopátrica
IV – 2	7,00	0,02	fragmentação alopátrica
IV – 3	31,00	0,00	fluxo gênico restrito com isolamento por distância
V – 1	16,32	0,01	inconclusivo
Total	39,03	0,01	inconclusivo

No clado H1 dois eventos de fragmentação alopátrica foram inferidos: um contrastando Turiaçu e H1 (Parnaíba, Pindaré e Tocantins); e outro separando os peixes do Rio Itapecuru daqueles dos rios Mearim e Pindaré. No maior nível de agrupamento, a NCA indicou fluxo gênico restrito com isolamento por distância.

No clado H11 foi inferido fluxo gênico restrito com isolamento por distância em um grupo composto por haplótipos do Parnaíba, Itapecuru, Mearim e Pindaré. Além disso, fragmentação alopátrica foi sugerida entre sequências do Turiaçu e dos trechos baixo Parnaíba e alto Pindaré.

A AMOVA, aplicada sobre todas as populações consideradas como um único grupo, mostrou baixa diferenciação entre as populações com a maior parte da variância acumulada no componente intra-grupos ($\Phi_{st} = 0,075$, Tabela 3-4). Uma AMOVA hierárquica, comparando os clados H1 e H11, indicou elevada diferenciação entre os clados ($\Phi_{st} = 0,805$, Tabela 3-5) com o clado H1 apresentando maior variação do que o clado H11.

Tabela 3-4. Resultados da AMOVA para as populações de *Hoplias malabaricus*. Va = variação entre populações; Vb = variação intra-populações.

Fonte de Variação	Porcentagem de Variação
Va	7,54%
Vb	92,46%
Φ_{st}	0,0754
P(Φ_{st})	<0.0001

Tabela 3-5. Resultado da AMOVA para comparação dos clados H1 e H11. Va = variação entre populações; Vb = variação intra-populações.

	Clado H1	Clado H11	H1 X H11
Va	70,91%	16,86%	80,56%
Vb	29,09%	83,14%	19,44%
Φ_{st}	0,709	0,168	0,805
P(Φ_{st})	<0.0001	<0.0001	<0.0001

3.3.2 Variação morfométrica

A análise das variáveis canônicas (AVC), aplicada sobre os escores das deformações parciais (Matriz W), indicou variações significantes entre as populações de *H. malabaricus* (Wilk's $\lambda = 0,021$; $F_{(120,250)} = 2,493$; $p < 0.01$). No espaço morfométrico composto pelos dois primeiros eixos canônicos (71,75% da variação acumulada) três grupos puderam ser estabelecidos, correspondendo às populações dos rios Parnaíba, Munim e Pindaré

(Figura 3-6). Espécimes dos rios Tocantins, Turiaçu e Itapecuru formaram um grupo isolado do Pindaré e intermediário entre Parnaíba e Munim. O terceiro eixo canônico explicou 16,9% da variação entre as amostras, discriminando Tocantins das demais populações (Figura 3-7).

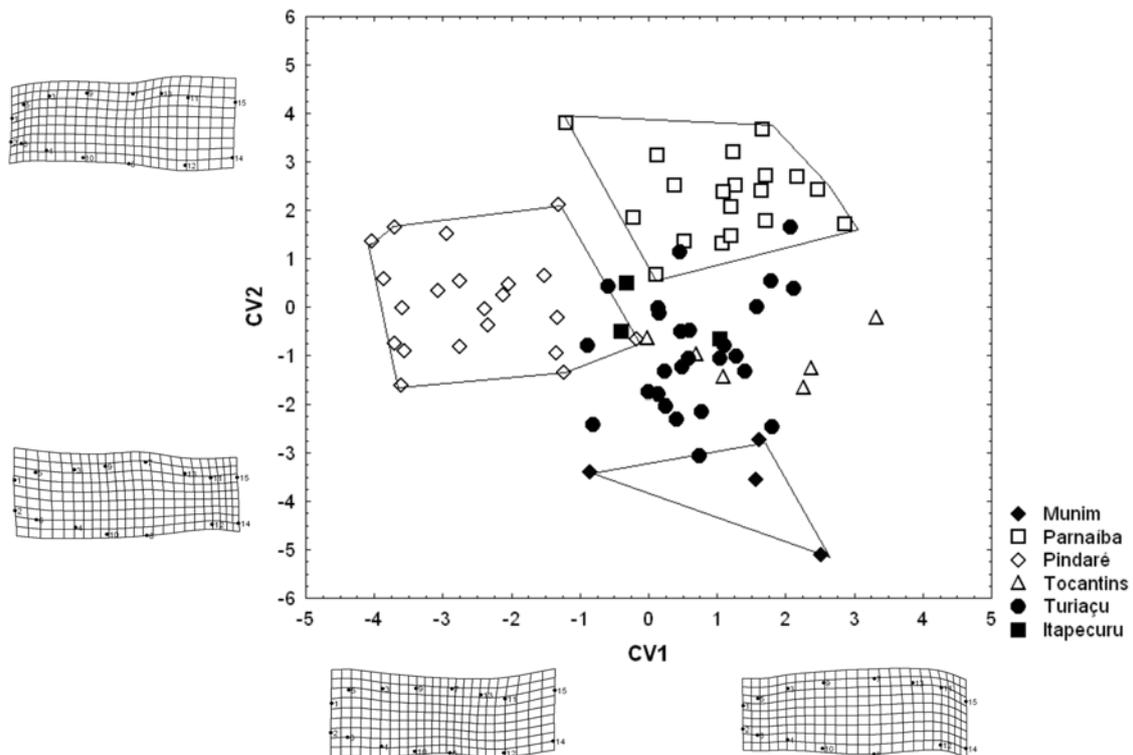


Figura 3-6. Ordenação das amostras de *Hoplias malabaricus* no espaço morfométrico das duas primeiras variáveis canônicas. À esquerda e abaixo do gráfico são mostradas as mudanças estimadas na forma do corpo associadas com cada eixo canônico. Números nas grades de deformação referem-se aos marcos anatômicos definidos sobre o corpo do animal.

A regressão dos dados originais sobre os escores canônicos indicaram as principais tendências de variação na forma, associadas com os eixos canônicos ($F_{\text{GOODAL}(120;1752)} = 3.36$; $p < 0.01$). No primeiro eixo canônico, exemplares do Pindaré são caracterizados por: maior altura da cabeça devido aos deslocamentos em direções opostas dos LMs 3 a 5; redução em altura e encurtamento da porção média do corpo pela convergência dos LMs 7, 9, 11 e 13; aumento em altura e alongamento da porção médio-posterior da região pré-anal promovido pelos deslocamentos dos pontos 11, 12, 14 e 15 (Figura 3-6).

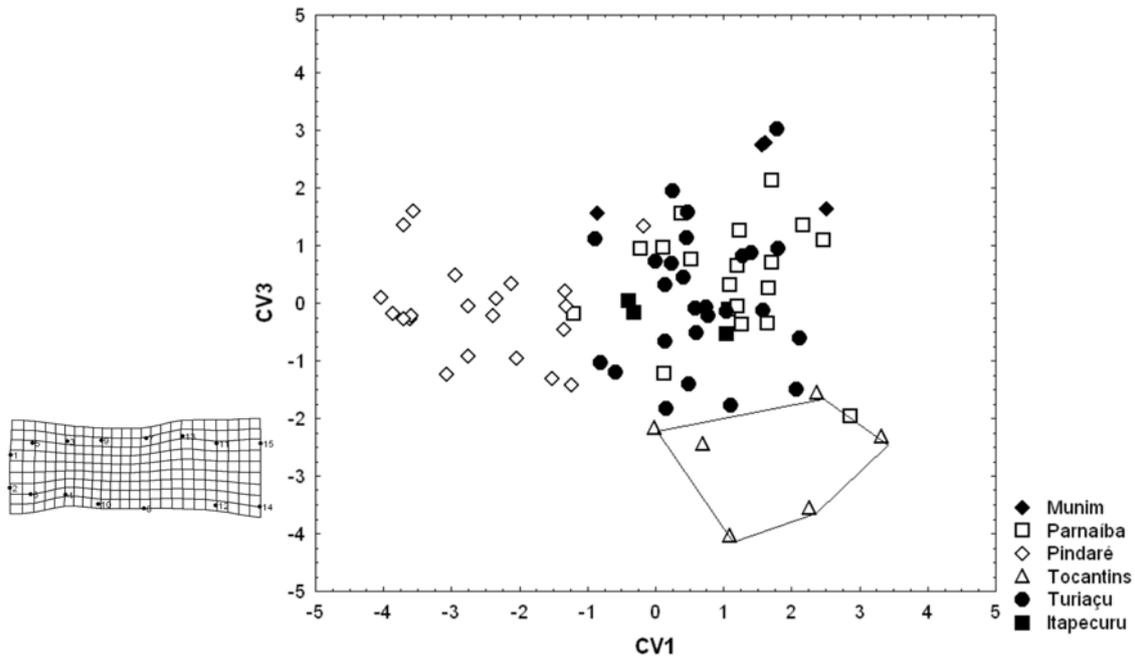


Figura 3-7. Ordenação das amostras de *Hoplias malabaricus* no espaço morfométrico da primeira e terceira variáveis canônicas. À esquerda do gráfico é mostrada a mudança estimada na forma do corpo associada com o terceiro eixo canônico. Números na grade de deformação referem-se aos marcos anatômicos definidos sobre o corpo do animal.

Os exemplares do rio Parnaíba foram definidos no segundo eixo canônico pelas seguintes características: região média do focinho curta devido ao deslocamento horizontal dos pontos 1-4; aumento em altura da região do corpo alinhada com a porção médio-posterior da nadadeira dorsal e alongamento da porção médio-posterior da região pré-anal configurado pelos deslocamentos dos marcos 11-15. Os indivíduos do rio Munim, por sua vez, foram caracterizados por: região média da cabeça alta e longa; porção médio-posterior da região pré-dorsal curta; região do corpo definida pelos marcos 11-17 estreita e baixa (Figura 3-6).

As amostras do Rio Tocantins, discriminadas ao longo do terceiro eixo canônico, foram definidas por uma redução generalizada na região do corpo localizada entre a cabeça e a origem da nadadeira dorsal como resultado dos deslocamentos convergentes dos

pontos 3, 4, 7, 8 e 9; alongamento e aumento em altura da porção médio-posterior da região pré-anal (Figura 3-7).

3.4 Discussão

3.4.1 Diferenciação genética

Animais com ampla distribuição geográfica ou com distribuição geográfica restrita, mas com limitada capacidade de dispersão tendem a apresentar diferenças morfológicas entre suas populações. Estas podem ser resultados de efeitos vicariantes, uma vez que populações mantidas separadas por um longo período de tempo tendem a se diferenciar como resultado da redução e/ou impedimento de troca genética (LUNDBERG *et al.*, 1998; AVISE, 2004; FREEMAN & HERRON, 2004).

Obviamente, as adaptações desenvolvidas pelos peixes para a vida em ambiente aquático é um fator limitante para a dispersão destes animais em ambiente terrestre. Entretanto, a distribuição de uma espécie de peixe em seu próprio ambiente é limitada, entre outros fatores, pela existência de barreiras geográficas entre as diferentes bacias hidrográficas. Assim, a hipótese estrutural de composição de comunidades (TOFTS & SILVERTOWN, 2000) e a hipótese nula sobre a distribuição geográfica de peixes (VARI, 1988) sugerem que um estudo biogeográfico envolvendo peixes de água doce deve levar em consideração o fato de que as espécies devem estar restritas às suas bacias atuais. Assim, cada bacia hidrográfica deve apresentar uma ictiofauna própria que é diferente daquela de outra bacia. Rejeição destas hipóteses e a observação de variações intraespecíficas dentro de uma mesma bacia hidrográfica ou de similaridades entre bacias distintas podem ser originadas por interações entre indivíduos e/ou espécies (p.ex. ROY *et al.*, 2004) ou por efeitos de eventos históricos

controlando o fluxo gênico, tornando cada bacia uma unidade de endemismo (p.ex. ALEXANDER *et al.*, 2006; VERGARA *et al.*, 2008).

Os nossos resultados indicaram alto grau de diferenciação genética na região controle do DNAmT de *H. malabaricus* quando comparado com outros peixes de água doce neotropical (i.e., SIVASUNDAR *et al.*, 2001; PRIOLI *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2003). Entretanto, a elevada variabilidade nas sequências de DNAmT das amostras do Maranhão aparenta ser uma característica comum da espécie, uma vez que variações significativas foram observadas por outros autores usando diferentes tipos de marcadores moleculares (DERGAM *et al.*, 1998; PERES *et al.*, 2002). Por outro lado, Dergam *et al.* (2002) observaram pequena diferenciação entre populações do Rio Doce quando analisaram sequências do 16S ribossomal do DNAmT.

É importante notar que a diferenciação observada ocorre em uma área geográfica onde apenas um citótipo foi previamente assinalado (BERTOLLO *et al.*, 2000), sugerindo que a variação no DNAmT é mais ampla do que a variação cromossômica. Entretanto, deve-se considerar que não há garantias de que apenas um citótipo ocorra nos rios do Maranhão, uma vez que Bertollo *et al.* (2000) estudaram apenas espécimes da Ilha de São Luís. Recentemente, Santos *et al.* (2009) detectaram elevada divergência molecular entre populações que partilhavam o mesmo cariótipo. Com base em dados preliminares, os autores sugerem que a evolução molecular dentro do complexo *H. malabaricus* é altamente variável e influenciada por fatores, tais como, eficiência no mecanismo de reparo do DNA, tempo de geração, taxa metabólica e processos demográficos. Devido às alterações nas taxas de substituição de DNA, promovida por tais fatores em espécies com ecologia similar à de *H. malabaricus*, Santos *et al.* (2009) apontam que estas não são recomendadas para a estimativa de tempos de divergências usando relógio molecular.

Os resultados da AMOVA revelaram uma pequena, mas significativa, diferenciação entre as populações quando analisadas como um único grupo. No entanto, os valores de Φ_{st} foram maiores quando o contraste foi realizado entre os dois clados identificados na APE. Cada um dos clados é formado por haplótipos procedentes dos rios amostrados. No clado H1, a variação interpopulações (V_a) foi cerca de 2,5 vezes maior do que a variação intrapopulações (V_b), enquanto que no clado H11 V_a foi cerca de cinco vezes menor do que V_b . A relação inversa entre V_a e V_b , observada nos clados H1 e H11, sugerem elevada variação entre e dentro das populações, corroborada pelos valores de divergência genética. Contudo, os fatores responsáveis por tal configuração são difíceis de identificar, podendo estar relacionados às características ecológicas e comportamentais da espécie, bem como a eventos antrópicos e históricos (este último é discutido na seção seguinte, em conjunto com os dados morfométricos).

Uma vez que *H. malabaricus* é uma espécie sedentária com pouco ou nenhum deslocamento migratório (ALMEIDA *et al.*, 1997; SUZUKI *et al.*, 2005), é provável que a diferenciação observada na amostra seja resultado de subestruturação ao longo dos rios. Além disso, eventos históricos naturais de longa duração, tal como a formação de um divisor de águas, e eventos antrópicos promovidos em curto espaço de tempo, mas com influência permanente, tal como a construção de uma barragem, podem promover diferenciação populacional através de restrição de fluxo gênico. Por exemplo, populações de *Salvelinus leucomaenis* de rios japoneses apresentam diferenças altamente significante acima e abaixo de barragens (YANAMOTO *et al.*, 2004).

Os impactos decorrentes da construção de barragens sobre as populações de peixes não estão restritos apenas à fragmentação e ao confinamento de partes destas em um novo ambiente lacustrino. As mudanças ambientais resultantes do barramento de rios são tão intensas que podem ser notadas à jusante da barragem (AGOSTINHO *et al.*, 2008). Hatanaka

& Galetti (2003), por exemplo, observaram diferenças entre populações de *Prochilodus argenteus* (*P. marggravii*) do Rio São Francisco em trechos abaixo da barragem de Três Marias. Resultados similares foram publicados por Wasko & Galetti (2002) ao estudarem populações de *Brycon orthotaenia* (*B. lundii*) na mesma região. Dessa forma, além do sedentarismo típico de *H. malabaricus*, a diferenciação observada no Rio Parnaíba e expressada na distribuição dos haplótipos nas árvores gênicas pode ser consequência da construção da barragem de Boa Esperança, situada entre os trechos médio e alto do rio.

Nos rios Pindaré e Turiaçu, por outro lado, as diferenciações genéticas podem ter sido fomentadas pelas características ecológicas de *H. malabaricus*. Nestes rios é muito comum a formação de lagoas marginais durante o período chuvoso, quando retém água e tornam-se isoladas do canal principal durante o período de estiagem. O Lago do Papagaio e o Lago do São Francisco são bons exemplos de lagoas marginais, estabelecidas no Rio Turiaçu (*observação pessoal*).

Se por um lado, as características ecológicas das espécies podem exercer um papel importante na redução dos efeitos oriundos da construção de barragens (REID *et al.*, 2008), por outro, elas podem aumentar o isolamento das populações pela redução de fluxo gênico. Por exemplo, há alguma probabilidade de que populações isoladas possam se estabelecer caso a espécie tenha preferência por habitats espacialmente desconectados.

H. malabaricus, além de sedentária, é uma espécie preferencialmente lacustrina como foi notado por Suzuki & Agostinho (1997) no Reservatório de Segredo (bacia do Rio Iguaçu). Devido às características ecológicas da espécie, os autores sugeriram que *H. malabaricus* teria sido beneficiada com o barramento do Rio Iguaçu, pois este evento teria aumentado a disponibilidade de alimento e de sítios com pouca correnteza para a desova.

Petry *et al.* (2003), em um estudo sobre as assembléias de peixes de lagoas e a conectividade entre elas na planície de inundação do Rio Paraná, observaram que *H.*

malabaricus ocorria principalmente em lagoas desconectadas do canal principal. Assim, a preferência por habitats lânticos e rasos associados ao sedentarismo desta espécie podem produzir pequenos isolados populacionais. Provavelmente, durante o período de estiagem quando o volume e a velocidade de fluxo da água são maiores, o canal principal do rio atua como uma barreira natural reduzindo a migração entre as populações lacustrinas.

A importância das lagoas marginais e a disponibilidade de alimentos para a estruturação das comunidades de peixes foram relatadas por vários autores (e.g. PETRY *et al.*, 2003; POMPEU & GODINHO, 2006; SOUSA & FREITAS, 2008). Por outro lado, a diferenciação genética e a estruturação das populações das espécies residentes nas lagoas marginais têm recebido pouca atenção. Peres *et al.* (2002) observaram alta similaridade entre populações de *H. malabaricus* de ambientes fluviais e lacustres no alto Paraná, embora tenham reconhecido que os dados de isoenzimas utilizados no estudo não tenha sido capaz de detectar o mesmo nível de variação observada por outros autores, que trabalharam com a espécie na região (e.g. DERGAM *et al.*, 1998).

Alguns indícios de que a diferenciação genética observada no presente estudo está associada ao isolamento parcial das populações em lagoas marginais apóia-se no relato de diferenças genéticas entre populações de peixes migradores, fragmentadas pela construção de barragens (HEGGENES & ROED, 2006; DEINER *et al.*, 2007). Além disso, variações morfológicas associadas ao habitat podem se estabelecer. Langerhans *et al.* (2003), por exemplo, observaram divergências morfológicas entre populações de canal e lagoas em *Bryconops caudomaculatus* e *Biotodoma wavrini* na Venezuela, concluindo que estas diferenças refletiam o balanço entre diversificação impulsionada por seleção natural e homogeneização promovida pela mistura de populações.

3.4.2 Análise combinada das informações genéticas e morfométricas

A análise morfométrica indicou que pelo menos quatro grupos distintos de populações de peixes podem ser identificados: Parnaíba, Pindaré, Munim e Tocantins. As diferenças entre eles estão associadas principalmente com variações na altura e encurtamento de algumas partes do corpo. De acordo com a AVC, a região médio-anterior do corpo é mais baixa nos indivíduos do Parnaíba, enquanto que a porção mediana do corpo é mais curta em exemplares do Pindaré. Espécimes do Munim apresentam área opercular mais ampla e encurtamento da região do corpo localizada entre as nadadeiras dorsal e anal. Indivíduos do Tocantins foram caracterizados pela combinação de área opercular ampla, porção média do corpo curta e baixa, e região médio-posterior do corpo alta.

De modo geral, variações intraespecíficas na forma dos peixes estão associadas com características ecomorfológicas (CAVALCANTI *et al.*, 1999; PIORSKI *et al.*, 2005; SIDLAUSKAS *et al.*, 2006). Alguns autores têm inferido que variações na forma do corpo estão associadas com diferenciação genética (KLINGENBERG *et al.*, 2003; O'REILLY & HORN, 2004). No presente trabalho, o padrão de discriminação gerado pela análise morfométrica foi diferente da diferenciação observada pelos dados genéticos, apresentando discrepâncias que podem ser resultados de fatores históricos responsáveis pela origem da diferenciação. Rosa *et al.* (2009), além de variações citogenéticas, observaram que o conjunto de amostras de *H. malabaricus* analisadas podiam ser agrupadas em três grupos morfometricamente distintos, provavelmente associados às características ambientais dos sítios de coleta. Huey *et al.* (2008) notaram que ambientes com maior variabilidade hidrológica suportam populações com maior diversidade genética. Assim, é possível que as variações genéticas e morfométricas, embora não concordantes entre si, observadas em *H. malabaricus* no presente estudo seja efeito de arquitetura de drenagem, em que as diferenças

hidrológicas entre as drenagens e as diferenças na estruturação de habitats promoveriam a formação de pequenos isolados populacionais.

A análise de NCA indicou a ocorrência de dois eventos históricos nos rios do Maranhão, uma vez que os dois grupos de haplótipos gerados pela APE são muito distantes e separados por mais de 100 passos mutacionais. Fragmentação alopátrica e fluxo gênico restrito prevaleceram no clado H1. Nesse grupo, eventos de fragmentação alopátrica foram assinalados para Turiaçu X [Parnaíba, Pindaré, Tocantins] e Pindaré-Mearim X Itapecuru. Teoricamente, a ocorrência de eventos alopátricos está necessariamente associada ao estabelecimento de alguma barreira geográfica que impede a dispersão de indivíduos além da sua área de distribuição, além de exigir tempo suficiente para que as populações tornem-se isoladas (BROOKS & McLENNAN, 1991; TEMPLETON, 2006).

Os valores elevados de Φ_{st} , obtidos em uma curta escala geográfica, associados aos eventos de fragmentação inferidos pela NCA são consistentes com um padrão de intenso fluxo gênico no passado, seguido por fragmentação rápida, resultando em populações de pequeno tamanho. Este processo foi seguido por diferenciação rápida a partir de um pool gênico ancestral orientado por deriva genética (TEMPLETON, 2006), que pode ter acontecido tanto através de dispersão seguido por isolamento nas bacias como por isolamento após um evento vicariante.

Análises de sequências de DNA do gênero *Hypostomus* e uma revisão da biogeografia dos peixes de água doce neotropicais sugeriram que variações no nível do mar teriam exercido um papel importante no controle da dispersão através da região costeira (MONTROYA-BURGOS, 2003; HUBERT & RENNO, 2006). Muito embora a hipótese de dispersão costeira possa ser utilizada para explicar os padrões de distribuição de algumas espécies de peixes (BEHEREGARAY *et al.*, 2002; NEAR *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 2004),

aparentemente ela não pode ser aplicada às populações de *H. malabaricus* dos rios do Maranhão.

As árvores haplotípicas sugerem algumas relações complexas entre os haplótipos. Por exemplo, haplótipos do alto Pindaré apresentam relações próximas com haplótipos do baixo Parnaíba, baixo-médio Itapecuru e médio Mearim. Atualmente, estas bacias estão isoladas uma da outra, exceto Mearim e Pindaré que constituem um sistema hidrográfico. Assim, as relações haplotípicas poderiam apontar a região costeira como principal rota de dispersão. Entretanto, os haplótipos H1 e H11 são conservativos e suas frequências em bacias isoladas poderiam indicar eventos de comunicação passada entre estas para explicar a topologia observada nas árvores.

Dada a baixa altitude dos terrenos onde estão implantadas as bacias hidrográficas do Maranhão e as características geológicas da região, é provável que os eventos transgressivos ocorridos entre o Mioceno e o Holoceno, descritos no Capítulo 2, possam em algum momento ter possibilitado a comunicação entre afluentes de bacias distintas. Essa visão é diferente da hipótese de dispersão costeira, segundo a qual a dispersão deve ocorrer via foz do rio durante os períodos regressivos. Uma discussão mais detalhada é apresentada no próximo capítulo.

Entretanto, na região do Golfão Maranhense são encontradas as desembocaduras de três bacias hidrográficas: Mearim, Pindaré e Itapecuru. Nas fases regressivas, o recuo do mar pode ter possibilitado a comunicação entre Mearim-Pindaré e Itapecuru, explicando as uniformidades observadas entre os peixes dessas drenagens.

Atualmente, há indícios para ocorrência de troca faunística entre o Mearim-Pindaré e o Itapecuru através de suas fozes. Durante a estação chuvosa, o aumento da descarga dos rios reduz a salinidade nas áreas próximas aos seus estuários. Este evento é mais notado na área do Golfão Maranhense, próximo à Ilha dos Caranguejos, onde a redução da

salinidade permite a captura de peixes primários dos gêneros *Hypostomus* e *Ageneiosus* (CARVALHO NETA & CASTRO, 2008).

Além dos eventos históricos, é importante destacar a possibilidade de que algum polimorfismo ancestral tenha ficado retido nas populações, pois os valores positivos de D de Tajima, embora não significantes, pode indicar efeitos de seleção balanceadora ou admistura (RAND, 1996). Uma vez que esses fenômenos podem colocar o ancestral mais recente em um tempo mais antigo do que o esperado sob neutralidade, a antiguidade de H1 e H11 pode ser reflexo de polimorfismo ancestral. Por outro lado, em situações com $D > 0$ seria esperado um excesso de haplótipos antigos e ramos longos nas árvores (RAND, 1996; FORD, 2002). Isso não foi observado no presente trabalho. Em geral, os ramos são curtos e apenas dois haplótipos aparentam ser mais antigos. Além disso, a distribuição geográfica dos haplótipos H1 e H11, ocorrendo em várias bacias distintas e que, atualmente, estão isoladas sustenta a hipótese de retenção de polimorfismo ancestral.

Assim, o padrão de relações haplotípicas observado pode ser resultado de “classificação incompleta de linhagens gênicas” (*lineage sorting*). Avise (2004) aponta que o processo evolutivo que define as relações filogenéticas entre pares de linhagens é dinâmico. Nos primeiros momentos de especiação, esse processo resulta principalmente em padrões polifiléticos e parafiléticos, antes de atingir a monofilia recíproca (AVISE, 2004). Além disso, o autor considera que espécies com tamanho efetivo elevado tendem a reter padrões polifiléticos ou parafiléticos por mais tempo do que espécies com menor tamanho efetivo. Dessa forma, o ordenamento aleatório de linhagens ancestrais compartilhadas pode obscurecer a história evolutiva de espécies recentes (McMILLAN & PALUMBI, 1995).

3.4.3 Consequências para a taxonomia

Dentre os eritrinídeos, *Hoplias* é o gênero que abriga o maior número de espécies e de taxonomia mais complicada. Das nove espécies que compõe o gênero, *H. malabaricus* é a que apresenta distribuição mais ampla, com as demais restritas a algumas áreas menores (OYAKAWA, 2003). Em uma revisão de *Hoplias*, Oyakawa (1990), considerou *H. malabaricus* e *H. lacerdae* um complexo de espécies composto por cerca de 11 formas diferentes. O caráter complexo da taxonomia de *H. malabaricus* foi reforçado por Bertollo *et al.* (2000) que, com o auxílio de marcadores citogenéticos, identificaram várias unidades biológicas independentes.

Recentemente, Mattox *et al.* (2006) definiram o status taxonômico de *H. aimara*, uma espécie que ocorre em simpatria com *H. malabaricus*. Dentre os vários caracteres examinados, dois permitem a discriminação precisa das duas espécies: a ausência de um acessório do ectopterigóide e a presença de uma mancha escura na porção média da membrana opercular em *H. aimara* (MATTOX *et al.*, 2006). Estas características não foram observadas em nenhum dos exemplares examinados neste trabalho sendo, portanto, considerados representantes de *H. malabaricus*. Além disso, os espécimes do Maranhão apresentam as margens contralaterais do dentário convergindo abruptamente em direção à sínfise mandibular, tomando a forma de um V quando observada ventralmente. Em *H. aimara* as margens do dentário formam um U (MATTOX *et al.*, 2006).

Apesar dos indícios de que a espécie em questão trata-se de *H. malabaricus*, as diferenças observadas tanto nos dados genéticos quanto nos morfométricos suportam a hipótese de que *H. malabaricus* é um complexo de espécie. A discriminação de populações via morfometria e a elevada diferenciação genética observada pode indicar a presença de mais de uma espécie de *Hoplias* na região. Esta hipótese é sustentada pelos elevados valores de distância genética observados entre as populações. Resultados similares permitiram a

identificação de endemismo regional em *Pimelodella chagresi* na América Central (MARTIN & BERMINGHAM, 2000). Nesta espécie, os autores observaram que as diferenças genéticas acopladas com as evidências de diferenciação morfológica sugeriam que *P. chagresi* é um complexo de espécies.

Por outro lado, a possibilidade de variância estocástica, inerente em análises envolvendo árvores gênicas, impossibilitaria a definição do status de uma espécie com base na avaliação monofilética de populações (HEY & MACHADO, 2003). Além disso, a suspeita de ordenamento incompleto de linhagens, com retenção de polimorfismo ancestral, impossibilita a interpretação das árvores gênicas como árvores de espécies (KORNFIELD & PARKER, 1997).

De qualquer maneira, tanto os dados genéticos quanto os morfométricos obtidos no presente trabalho suportam a hipótese de que *H. malabaricus* é um complexo de espécie e encorajam uma revisão na taxonomia desse grupo que considere a diversidade observada na área geográfica do presente estudo.

4 DIVERSIDADE E FILOGEOGRAFIA DE *PROCHILODUS LACUSTRIS* STEINDACHNER 1907 (CHARACIFORMES: PROCHILODONTIDAE) NO NORDESTE DO BRASIL

4.1 Introdução

A família Prochilodontidae é facilmente reconhecida pela presença de lábios carnosos portando duas séries de minúsculos dentes falciformes ou espatulados. A protração dos lábios possibilita a formação de um disco oral, que permite o forrageio sobre matéria orgânica morta ou perifiton (BOWEN *et al.*, 1984; ARAÚJO-LIMA *et al.*, 1986; SANTOS *et al.*, 2004). Uma das características marcantes desse grupo é sua capacidade migratória, com relatos de movimentos de até 43 km diários, e sua habilidade em transpor obstáculos naturais (GODOY, 1975; GOULDING, 1981).

A família Prochilodontidae está distribuída por toda a América do Sul, abrigando 21 espécies, distribuídas em três gêneros: *Ichthyolephas*, *Prochilodus* e *Semaprochilodus* (CASTRO & VARI, 2003). Destes, o mais especioso é *Prochilodus* com 13 espécies descritas atualmente. Este gênero se diferencia dos demais pela posse de escamas ctenóides, presença de escamas normais entre o final da base da nadadeira dorsal e origem da adiposa, ausência de processo espatulado membranoso posterior; nadadeiras anal e caudal sem faixas escuras; caudal sem manchas ou com 2 a 8 fileiras irregulares e sinuosas de pequenas manchas escuras formadas por agrupamentos de cromatóforos (CASTRO & VARI, 2004).

Prochilodus lacustris Steindachner, 1907 é o único representante da família na área de estudo, caracterizada pela posse de escamas do corpo com padrão cruciforme de subdivisões radiais, mas sem padrão complexo de subdivisões secundárias; linha lateral com 46 a 51 escamas perfuradas e 8 a 11 fileiras horizontais de escamas da origem da nadadeira pélvica à linha lateral (CASTRO & VARI, 2004). Aparentemente, a espécie é endêmica dos

rios Parnaíba e Mearim, apresentando a seguinte diagnose (PIORSKI *et al.*, 2007): peixes de médio porte; corpo moderadamente alto, sua altura cerca de 2,8 vezes a medida do comprimento padrão; dentes diminutos presentes nos lábios; cabeça contida cerca de 5,5 vezes no comprimento padrão, mais alta que comprida, sua altura 0,9 vezes o seu comprimento; comprimento do focinho 1,4 vezes e diâmetro do olho 2,9 vezes no comprimento da cabeça. Proporções corporais em relação ao comprimento padrão: distância pré-dorsal 2,1; distância pré-pélvica 2,0; distância pré-anal 1,3; distância dorsal-adiposa 4,0; distância focinho-peitoral 3,5; altura do pedúnculo caudal 9,1. Nadadeira dorsal com ii+9 raios, sua base contida cerca de 5,9 vezes no comprimento padrão; nadadeira peitoral com i+12 raios, seu comprimento contido cerca de 5,0 vezes no comprimento padrão; nadadeira pélvica com i+8 raios e seu comprimento contido 5,0 vezes no comprimento padrão; nadadeira anal com ii+8 raios, sua base contida cerca de 9,1 vezes no comprimento padrão; nadadeira caudal com iii+18+iii raios. Linha lateral com 48 escamas perfuradas, 19 escamas na linha transversal e 18 escamas na linha pré-dorsal. Padrão de colorido, em álcool, cinza no dorso e clara no ventre, com pontos escuros nas nadadeiras dorsal e caudal.

Estudos filogeográficos das espécies do gênero *Prochilodus* têm destacado a importância da família para análises filogeográficas em uma escala espacial ampla. Sivasundar *et al.* (2001) estudaram as relações filogenéticas entre as espécies de *Prochilodus* das bacias do Paraná, Amazonas, Orinoco e Madalena, concluindo que cada bacia abrigava um grupo monofilético de linhagens mitocondriais. Esta conclusão foi suportada por uma ampla revisão taxonômica da família em que a maioria das espécies reconhecidas para o gênero apresentava distribuição restrita a uma única drenagem (CASTRO & VARI, 2004).

Turner *et al.* (2004), entretanto, em um estudo restrito às espécies do extremo norte da América do Sul, observaram que as amostras de *P. rubrotaeniatus* formavam

agrupamentos parafiléticos, em que indivíduos do Orinoco partilhavam um ancestral comum com *P. mariae*, sugerindo a ocorrência de espécies crípticas na área.

Estudos em escalas espaciais menores foram realizados para *P. lineatus* na bacia do Rio Paraná (SIVASUNDAR *et al.*, 2001), *P. argenteus* (HATANAKA *et al.*, 2006) e *P. costatus* (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2008) no Rio São Francisco, indicando elevado fluxo gênico entre as populações (*P. lineatus* e *P. costatus*) ou subestruturação de populações (*P. argenteus*).

Até o momento, nenhum estudo foi publicado usando dados moleculares em análises comparativas de populações de peixes dos rios do Estado do Maranhão. A região é geralmente considerada uma área de endemismo para peixes de água doce (LUNDBERG *et al.*, 1998; HUBERT & RENNO, 2006), cuja diversificação e relações com as drenagens vizinhas foram tentativamente explicadas através das hipóteses de dispersão costeira e museu (MONTROYA-BURGOS, 2003; HUBERT & RENNO, 2006).

De acordo com a hipótese de dispersão costeira, espécies amazônicas ou do escudo das Guianas teriam colonizados os rios Maranhenses através de rotas de dispersão estabelecidas ao longo da costa durante as fases regressivas do mar (MONTROYA-BURGOS, 2003). Adicionalmente, Hubert & Renno (2006), a partir da análise dos dados de distribuição de Characiformes, postularam a existência de uma área de refúgio no Rio Parnaíba, onde as espécies eram isoladas durante as transgressões mais intensas, recolonizando as áreas próximas quando o mar regrediu. Em ambos os casos, as mudanças de nível do mar seria o fator postulado como principal responsável pela diversificação nos rios do Maranhão.

Dessa forma, o presente capítulo pretende analisar a diversidade genética de *P. lacustris*, verificando a validade da hipótese de que a espécie é uma unidade taxonômica e endêmica para a região. Além disso, a partir da análise de informações do relógio molecular e dos dados geológicos disponíveis, tem-se o objetivo de identificar os eventos históricos de

isolamento das drenagens, apresentando-os como alternativa para a hipótese de dispersão costeira.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Diversidade genética

Amostras de tecidos de 125 indivíduos de *P. lacustris* foram coletadas a partir de pedaços de nadadeiras e preservadas em etanol absoluto. Os exemplares utilizados eram procedentes de 14 localidades ao longo dos rios Parnaíba, Itapecuru, Mearim, Pindaré, Turiaçu e Tocantins (Tabela 4-1, Figura 3-1). Material de referência, quando disponível, foi depositado na Coleção de Peixes do Departamento de Oceanografia e Limnologia (CPDOL) da Universidade Federal do Maranhão.

Tabela 4-1. Número de indivíduos de *P. lacustris* obtidos nos locais de coleta.

Locais de coleta	Bacia hidrográfica	N
Colinas	Itapecuru (alto)	1
Rosário	Itapecuru (baixo)	10
Codó	Itapecuru (médio)	14
Arari	Mearim (baixo)	8
Lago Açú	Mearim (médio)	12
Santa Quitéria	Parnaíba (baixo)	9
Guadalupe	Parnaíba (médio)	4
São João dos Patos	Parnaíba (médio)	16
Nova Iorque	Parnaíba (médio)	2
Penalva	Pindaré (baixo)	10
Pindaré-Mirim	Pindaré (baixo)	10
Buriticupu	Pindaré (médio)	9
Tucuruí	Tocantins	8
Santa Helena	Turiaçu (médio)	12
Total		125

O DNA genômico foi extraído usando uma modificação do método do tampão salino, descrito por Aljanabi & Martinez (1997). Em seguida, um fragmento de cerca de 700

pares de bases da região controle do DNA mitocondrial (DNAm_t) foi amplificado através de PCR usando os primers F-TTF (SIVASUNDAR *et al.*, 1993) e H16498 (KOCHER *et al.*, 1989). O mix para a reação de PCR foi preparado para um volume final de 30 µl contendo solução tampão fornecida com o kit, 2 mM de MgCl₂, 100 µM de dNTP mix, 0,4 µM de cada primer, 1,5 unidades de Taq Polymerase e 50 ng de DNA. As condições de PCR para amplificação do fragmento foram as seguintes: 35 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 51°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos com um incubamento inicial a 94°C por 2 minutos e extensão final a 72°C durante 5 minutos.

O DNA disponível também foi utilizado para a amplificação do primeiro íntron do gene S7. Neste caso, um fragmento de 657 pares de bases foi obtido usando os primers S7PEX1F e S7PEX2R (CHOV & HAZAMA, 1998). As amostras de DNA (50 ng) foram preparadas para amplificação em um mix ajustado para um volume final de 30 µl contendo: solução tampão fornecida com o kit, 8 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP mix, 1,0 µM de cada primer e 0,75 unidades de Taq Polymerase. As condições de PCR para amplificação do fragmento foram as seguintes: 34 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 58°C por 60 segundos e 72°C por 2 minutos com um incubamento inicial a 94°C por 2 minutos e extensão final a 72°C durante 8 minutos.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%, purificados usando o kit PurelinkTM PCR Purification (Invitrogen) ou GFX PCR (GE Healthcare), e sequenciados em um sequenciador automático MegaBase com os mesmos primers utilizados na amplificação.

As sequências foram alinhadas usando o programa ClustalX 2.0.3 (THOMPSON *et al.*, 1997) e a qualidade do alinhamento inspecionada visualmente. O nível de saturação das sequências foi avaliado através da análise gráfica do número de

substituições, separadas em transições e transversões, em função da distância de Tamura – Nei (1993). Esse procedimento foi realizado no DAMBE (XIA, 2002).

O número de haplótipos e os índices básicos de diversidade genética foram obtidos com o pacote Arlequin 3.1.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Neste foram calculados a diversidade haplotípica (H), a diversidade nucleotídica (π) e o número de sítios polimórficos. A hipótese nula de neutralidade seletiva das sequências foi testada usando os testes D (TAJIMA, 1989) e F_s (FU, 1997). Desvios significantes nestes testes podem ocorrer em situações de expansão populacional recente ou efeito gargalo, onde nenhuma vantagem seletiva entre os haplótipos existe (RAND, 1996). Nos casos em que os testes indicaram desvios da neutralidade uma análise de *mismatch distribution* foi realizada no Arlequin 3.1.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) para verificar se os dados se ajustam a um modelo de expansão populacional.

A distribuição da variação genética entre as localidades amostradas foi avaliada aplicando-se uma AMOVA ao conjunto de dados usando o programa Arlequin 3.1.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Taxas de migração entre populações foram calculadas usando a aproximação padrão de Wright (1951): $N_f m \approx 0,5[(mtF_{st})^{-1} - 1]$, onde (mt) é um marcador mitocondrial, N_f é o tamanho efetivo de fêmeas na população e m é a taxa de migração por indivíduo.

Uma análise dos cladogramas aninhados (*Nested Clade Analysis* -NCA) foi realizada com base na rede de haplótipos usando o GEODIS 2.5 (POSADA *et al.*, 2000) para identificar os processos naturais responsáveis pelas diferenciações genéticas detectadas entre as populações.

4.2.2 Relações haplotípicas

Uma rede de haplótipos foi gerada pelo método de parcimônia estatística no programa TCS 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000) estabelecendo um critério de parcimônia de

95% (TEMPLETON, 1998). Árvores haplotípicas foram obtidas pelos métodos de agrupamento de vizinhos (*Neighbor Joining*-NJ) no programa MEGA versão 4 (TAMURA *et al.*, 2007) e máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*-ML) no Treefinder (JOBBER, 2008). O modelo de evolução molecular mais apropriado para o conjunto de dados para estimar a topologia ML foi encontrado com auxílio do programa JModeltest 0.1.1 (POSADA, 2008).

A homogeneidade da taxa de substituição entre as linhagens identificadas nas árvores haplotípicas foi avaliada pelo teste de taxa relativa (RRT), usando o RRTree versão 1.1 (ROBINSON-RECHAVI & HUCHO, 2000) e pelo teste de razão de verossimilhança (LRT) disponível no JModeltest 0.1.1 (POSADA, 2008).

Os tempos de divergências entre as principais linhagens foram estimados no programa MCMCtree do pacote PAML versão 4.3 (YANG, 2007). Neste programa as estimativas são realizadas segundo uma abordagem Bayesiana através de cadeias markovianas de Monte Carlo (MCMC), usando um processo similar à coalescência para definir os tempos de divergência *a priori* (YANG & RANNALA, 2006). Esse procedimento permite o cálculo de um relógio molecular relaxado com o uso de intervalos de tempos (*soft bounds*) para calibração dos nós, possibilitando a geração de intervalos de confiança associados aos valores estimados (YANG & RANNALA, 2006; RANNALA & YANG, 2007).

Foi calculado o relógio molecular usando *soft bounds*, estabelecendo o limite máximo de 5 Ma para fixação do ancestral comum a todos os haplótipos de *P. lacustris*. Um segundo ponto de calibração foi estipulado no nó T4 (Figura 4-7), correspondendo a um intervalo de tempo de 2 a 4 Ma. As idades utilizadas para calibração correspondem a episódios geológicos bem definidos. Dois destes tiveram impactos marcantes sobre os rios da região, tais como, o momento final do processo orogenético dos Andes, com repercussões sobre todas as bacias intracratônicas da América do Sul, consolidado no Mioceno-Plioceno; e

o início do Ciclo Velhas, quando os cursos atuais dos rios maranhenses estavam se estabelecendo, tal como discutido no Capítulo 1.

Diante da incerteza quanto à data estimada para calibração da árvore, um modelo alternativo foi testado usando o programa MCMCcoal versão 1.2 (RANNALA & YANG, 2003). Tal como o MCMCtree, o MCMCcoal realiza uma análise Bayesiana através de cadeias markovianas de Monte Carlo (MCMC) para estimar o parâmetro τ , que é o tempo de divergência multiplicado pela taxa de mutação μ . Ao contrário do MCMCtree, o MCMCcoal estima os tempos de divergências diretamente a partir das sequências alinhadas, sem a necessidade de pontos de calibração.

4.3 Resultados

4.3.1 Região controle do DNA mitocondrial

4.3.1.1 Diferenciação genética

A análise das sequências da região controle do DNAm_t de 102 indivíduos de *Prochilodus lacustris* permitiu a identificação de 45 haplótipos, definidos por 56 sítios polimórficos. O modelo de evolução molecular que melhor se ajustou ao conjunto de dados foi HKY+I+G, com taxa transição/transversão igual a 25,76, frequências das bases A = 0,332, C = 0,194, G = 0,133 e T = 0,344, e parâmetro α da distribuição gama igual a 0,577. Este modelo foi selecionado pelo programa JModeltest (POSADA, 2008), utilizando os critérios AICc e BIC que produziram pesos 0,5284 e 0,8037, respectivamente, para o modelo escolhido.

A análise gráfica do nível de saturação das sequências revelou que nenhum dos tipos de substituição (transição e transversão) apresentou saturação (Figura 4-1).

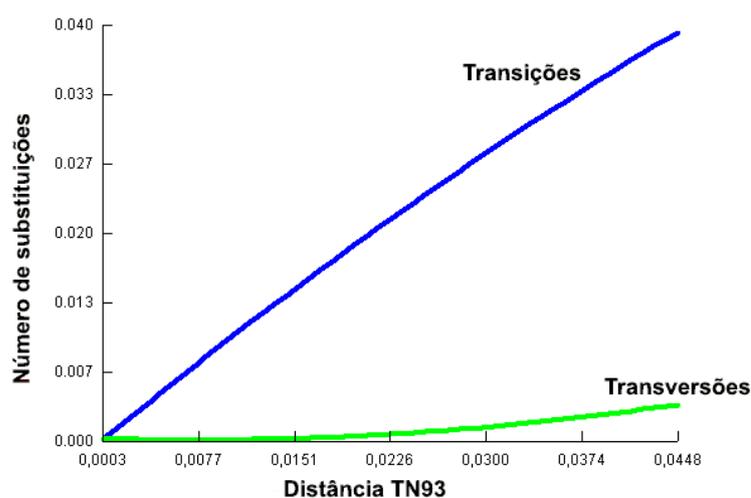


Figura 4-1. Nível de saturação das transições e transversões no conjunto de dados da região controle do DNAmT, avaliado pela distância Tamura-Nei (1993).

A variação genética nos sítios amostrados apresentou alta diversidade haplotípica ($H=0,96$) e baixa diversidade nucleotídica ($\pi = 0,013$). Os maiores valores de H foram observados nos rios Parnaíba, Tocantins e Pindaré, ao passo que o valor mais baixo para esse índice foi obtido na população do Rio Turiaçu. A diversidade nucleotídica, por sua vez, foi maior no Tocantins e os menores valores foram observados nos rios Mearim, Itapecuru e Pindaré (Tabela 4-2). Da mesma forma, os valores de Θ , estimados a partir do número de sítios segregantes (Θ_s) e da diversidade nucleotídica ($\Theta\pi$), foram maiores nos rios Parnaíba e Tocantins, e menores no Mearim.

O teste D de Tajima não indicou desvios da hipótese de neutralidade para nenhuma população isoladamente e nem para o conjunto de amostras, tomadas como uma única população. O teste F_s de Fu, por outro lado, apresentou valores discrepantes entre as populações. De acordo como este índice, os dados de Parnaíba e Pindaré não seguem um modelo de evolução neutra. O mesmo aconteceu quando se considerou as amostras como uma única população (Tabela 4-2). Uma vez que altos valores negativos e significantes da

estatística F_s podem indicar expansão demográfica (FU, 1997), as populações com F_s significante foram submetidas a uma análise de *mismatch distribution* (MD).

Tabela 4-2. Características moleculares de *Prochilodus lacustris* com base em sequências da região controle do DNAm.

	Parnaíba	Itapecuru	Mearim	Pindaré	Turiaçu	Tocantins	Total
Indivíduos	21	21	16	27	10	7	102
Haplótipos	16	6	8	15	4	6	49
Theta S	9,02 ± 3,38	3,95 ± 1,65	2,71 ± 1,23	5,45 ± 2,04	5,3 ± 2,47	8,98 ± 4,36	7,73 ± 2,20
Theta pi	10,67 ± 5,67	5,98 ± 3,33	3,2 ± 1,96	6,68 ± 3,62	8,06 ± 4,63	17,55 ± 10,2	8,87 ± 4,57
H (div. haplotípica)	0,99 ± 0,018	0,8 ± 0,054	0,85 ± 0,075	0,93 ± 0,031	0,53 ± 0,18	0,95 ± 0,09	0,96 ± 0,01
π (div. nucleotídica)	0,015 ± 0,008	0,008 ± 0,004	0,005 ± 0,003	0,009 ± 0,005	0,011 ± 0,007	0,025 ± 0,014	0,013 ± 0,007
D de Tajima	-0,59	0,68	0,04	-0,42	-0,13	1,06	0,46
P(D)	0,31	0,78	0,57	0,38	0,48	0,89	0,74
F_s de Fu	-11,60	2,43	-1,77	-4,22	3,09	0,26	-20,94
P(F_s)	0,00	0,87	0,14	0,04	0,93	0,45	0,00

A análise MD, aplicada sobre toda a amostra configurada como uma única população, Parnaíba e Pindaré, não confirmaram a ocorrência de eventos de expansão demográfica, tal como sugerido pela estatística F_s . Para todos os grupos, a distribuição de frequência das diferenças observadas entre os pares de sequência segue um padrão multimodal, típico de populações estacionárias (EXCOFFIER *et al.*, 2005), não ocorrendo ajuste significativo com o modelo esperado de expansão súbita (P_{SSD} e $P_T > 0,05$) (Figura 4-2).

As divergências genéticas das populações de *P. lacustris*, quando comparadas com o haplótipo de *P. nigricans* da Amazônia, foram sempre altas, variando de 3,5% (Parnaíba) a 4,4% (Itapecuru) (Tabela 4-3). Considerando-se apenas as amostras de *P. lacustris*, observa-se que a divergência entre populações variou de 0,6% (Itapecuru X Mearim) a 2,3% (Tocantins X Itapecuru). Entre os pares de amostras contrastadas, procedentes dos rios Mearim, Pindaré e Itapecuru, a divergência não passou de 0,8%. Estas amostras, quando comparadas com Parnaíba, Turiaçu e Tocantins, apresentaram divergência variando de 1,7% (Mearim X Turiaçu, Pindaré X Turiaçu) a 2,3% (Tocantins X Itapecuru).

Por outro lado, Parnaíba, Turiaçu e Tocantins, quando contrastadas, apresentaram divergência variando de 1,3% (Turiaçu X Tocantins) a 1,7% (Tocantins X Parnaíba, Turiaçu X Parnaíba) (Tabela 4-3).

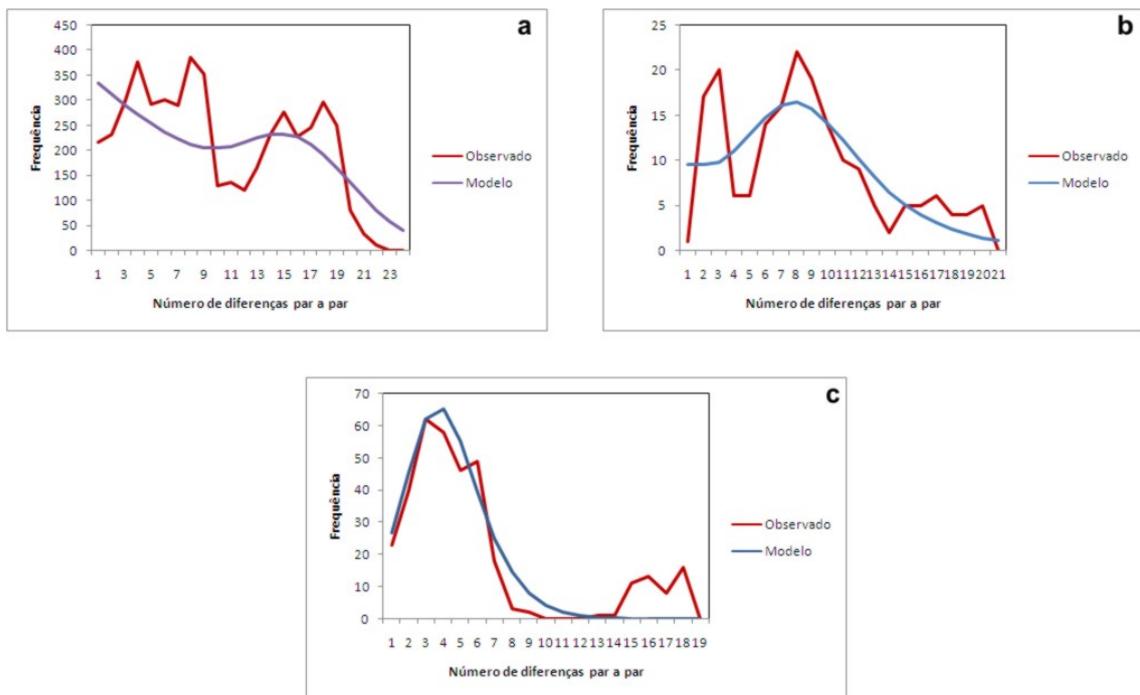


Figura 4-2. Distribuição mismatch com base em seqüências da região controle do DNAm_t para: a) uma população com todas as amostras, b) Parnaíba e c) Pindaré.

Tabela 4-3. Divergência genética par a par entre as populações de *Prochilodus lacustris* com base em seqüências da região controle do DNAm_t. Valores abaixo da diagonal são diferenças entre grupos. Valores na diagonal são diferenças dentro dos grupos.

	<i>P. nigricans</i> (AM)	Mearim	Pindaré	Itapecuru	Parnaíba	Tocantins	Turiaçu
<i>P. nigricans</i> (AM)	-						
Mearim	0,042	0,0053					
Pindaré	0,041	0,007	0,0098				
Itapecuru	0,044	0,006	0,008	0,0077			
Parnaíba	0,035	0,02	0,019	0,022	0,0116		
Tocantins	0,037	0,02	0,02	0,023	0,017	0,0114	
Turiaçu	0,037	0,017	0,017	0,019	0,017	0,013	0,019

As distâncias genéticas entre os haplótipos, dentro de cada população, indicaram que Mearim foi a mais homogênea (0,5% de divergência entre haplótipos) e que em Turiaçu, a divergência dentro chegou a 1,9% (Tabela 4-3).

A AMOVA, aplicada sobre o conjunto de dados, indicou alta estruturação na amostra ($\Phi_{st} = 0,49$), com cerca de metade da variação (49,18%) acumulada no componente intergrupo (Tabela 4-4).

Tabela 4-4. Resultados da AMOVA para as populações de *Prochilodus lacustris*, com base nas sequências da região controle do DNAm. Va = variação entre populações; Vb = variação dentro de populações.

Fonte de Variação	g.l.	SSQ	Componente da variância	Porcentagem de Variação
Va	5	323,17	3,77	49,18%
Vb	94	362,72	3,89	50,82%
Total	99	688,89	7,66	
Φ_{st}		0,49		
P(Φ_{st})		< 0,001		

As comparações par-a-par de Φ_{ST} (Tabela 4-5) produziram valores altos e significantes entre todos os pares de populações, exceto Mearim-Pindaré. Inversamente, os valores de N_{fm} foram baixos, indicando ausência de fluxo gênico entre os pares comparados. No par Mearim-Pindaré, ao contrário dos demais, foi estimado elevado fluxo gênico (Tabela 4-5).

Tabela 4-5. Comparação par a par dos valores de Φ_{ST} (abaixo da diagonal) e N_{fm} (acima da diagonal) entre as localidades amostradas de *P. lacustris*, com base nas sequências da região controle do DNAm.

	Parnaíba	Itapecuru	Mearim	Pindaré	Turiaçu	Tocantins
Parnaíba	-	0,36	0,30	0,40	0,67	1,21
Itapecuru	0,58*	-	4,22	6,68	0,47	0,63
Mearim	0,63*	0,11*	-	-97,40	0,32	0,50
Pindaré	0,55*	0,07*	-0,01 ns	-	0,52	0,74
Turiaçu	0,43*	0,51*	0,61*	0,49*	-	1,53
Tocantins	0,29*	0,44*	0,50*	0,40*	0,25*	-

* $P < 0,05$; ns – não significante

4.3.1.2 Padrões de relações entre os haplótipos

A árvore haplotípica, gerada pelo método de Máxima Verossimilhança (MV), foi produzida utilizando um haplótipo de *Prochilodus nigricans* (GENBANK AY 91437) do Rio Amazonas como grupo externo, e a consistência dos clados foram testados através de 10000 *bootstrap*.

O padrão de relações haplotípicas na árvore de Máxima Verossimilhança (MV) é composto por três clados com altos valores de *bootstrap* ($> 70\%$) (Figura 4-3). Um clado é composto pelos haplótipos do Rio Parnaíba, com um haplótipo do trecho médio do Rio Pindaré (H4) inserido entre eles. O segundo clado é composto pelos haplótipos dos rios Itapecuru, Mearim e Pindaré, com dois haplótipos do trecho médio do Rio Parnaíba (H18 e H21) inserido entre eles. O haplótipo H18 é basal em relação a todos os demais membros do clado, enquanto que o haplótipo H21 forma um clado com um membro do baixo Itapecuru (H29). Nos clados [Itapecuru-Mearim-Pindaré] e [Parnaíba] é possível observar, ainda, a formação de clados menores com elevados valores de *bootstrap* (Figura 4-3). O terceiro clado é formado por haplótipos dos rios Tocantins e Turiaçu, basal em relação ao clado Mearim.

O padrão geral com três clados, produzidos pela árvore MV, foi repetido na árvore gerada pelos métodos de Agrupamento de Vizinhos (AV) (Figura 4-4). Também, as posições dos haplótipos H4 (médio Pindaré) e H21 (médio Parnaíba) foram mantidas.

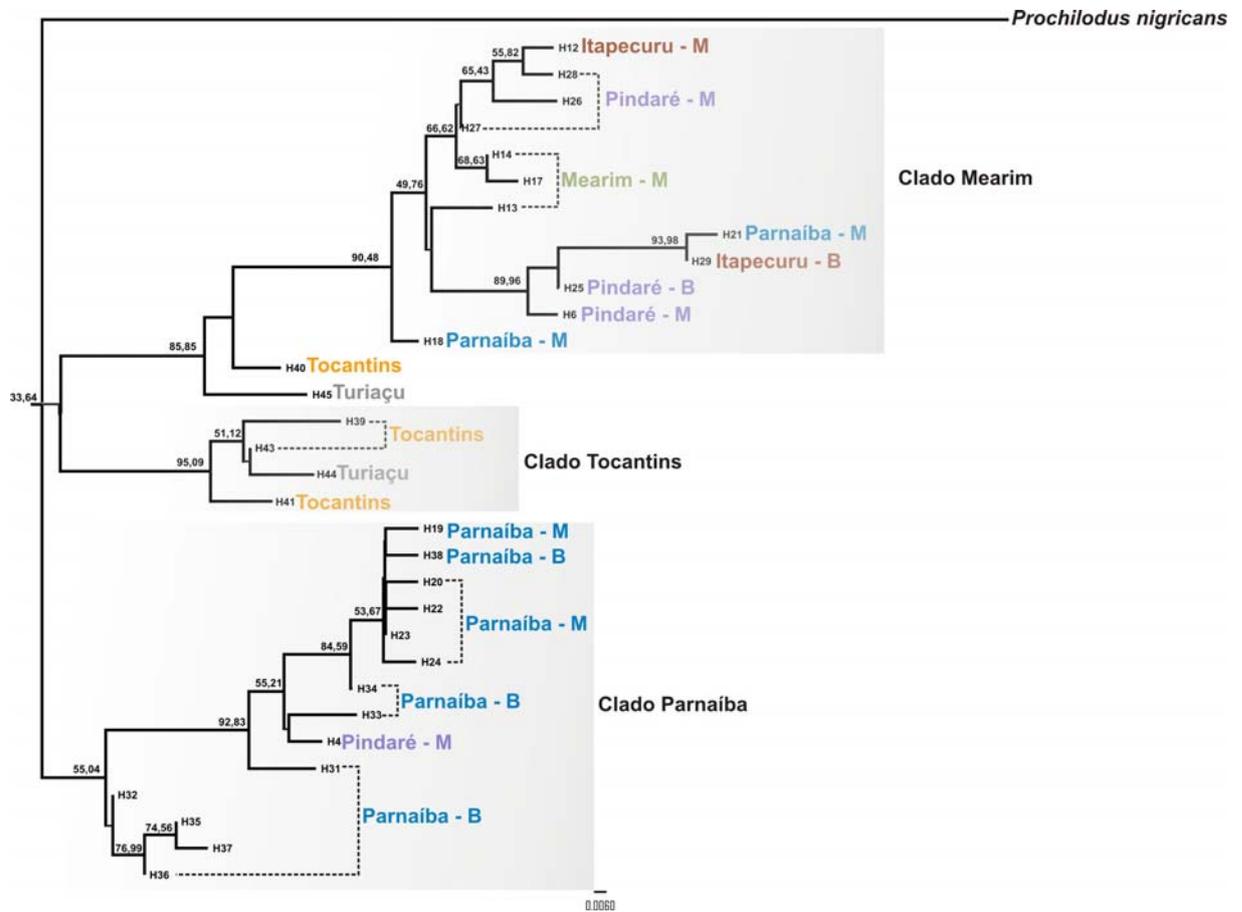


Figura 4-3. Árvore haplotípica de *Prochilodus lacustris*, gerada pelo método de Máxima Verossimilhança aplicado sobre um conjunto de seqüências da região controle do DNAm. B = baixo; M = médio, em referência aos diferentes trechos dos rios.

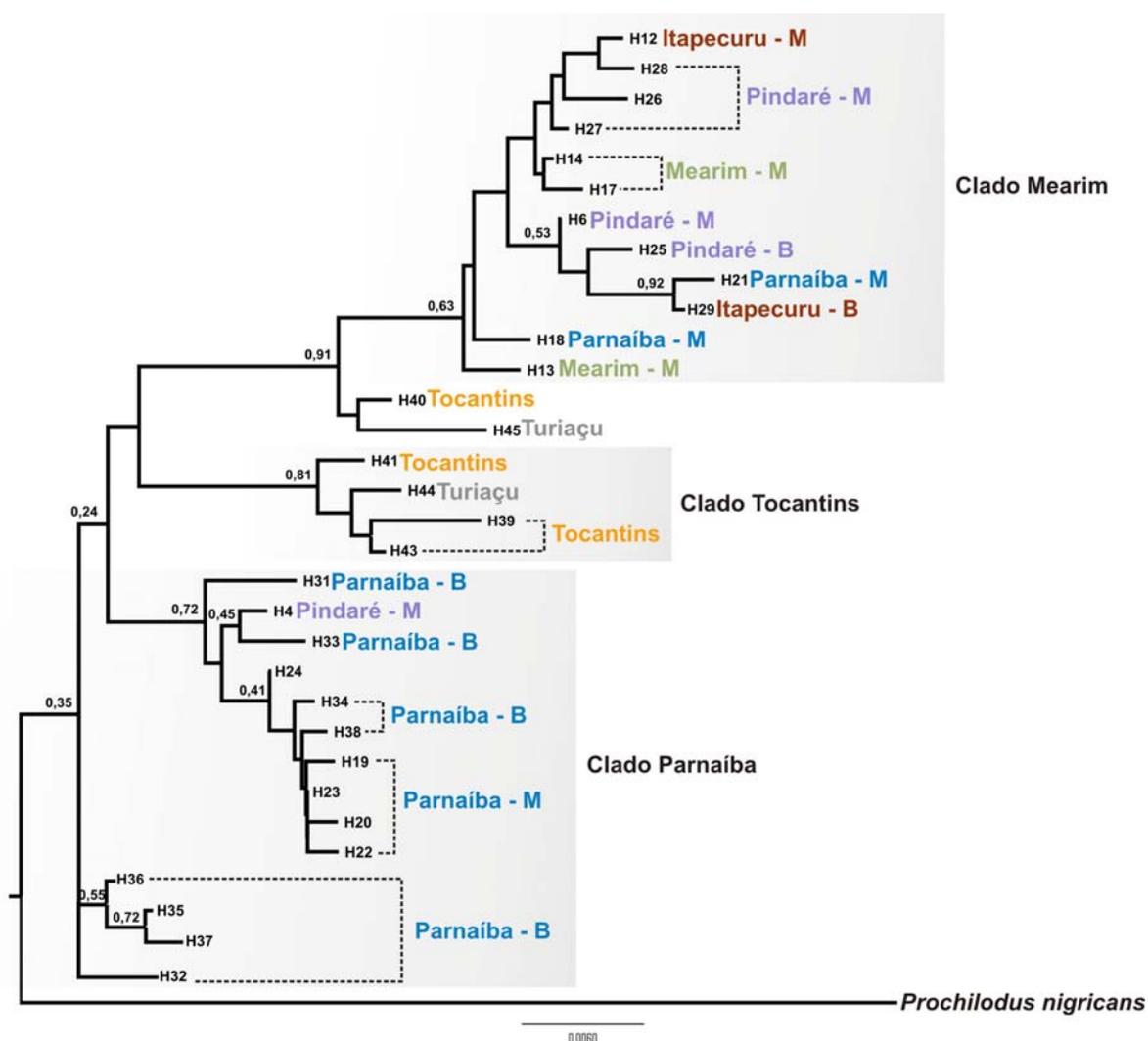


Figura 4-4. Árvore haplotípica de *Prochilodus lacustris*, gerada pelo método de Agrupamento de Vizinhos aplicado sobre um conjunto de seqüências da região controle do DNAm. B = baixo; M = médio, em referência aos diferentes trechos dos rios.

A rede de haplótipos, gerada pelo método de Parcimônia Estatística (PE), produziu padrões similares aos métodos anteriores (Figura 4-5). Nesta rede o haplótipo mais antigo é H1, presente em todos os rios amostrados, exceto Parnaíba.

Três conjuntos de haplótipos podem ser identificados. Um grupo é composto pelos haplótipos dos rios Itapecuru, Mearim e Pindaré (Clado Mearim), com dois haplótipos recentes do rio Parnaíba (H18 e H21) inseridos. Estes conectam-se à rede através de um haplótipo do baixo Itapecuru e de outro compartilhado por baixo Itapecuru e baixo Pindaré. O haplótipo H26, presente no médio Pindaré, é basal fazendo a conexão com o restante da rede.

O segundo grupo, separado por 12 passos mutacionais do anterior, é constituído por haplótipos do rio Parnaíba, incluindo um compartilhado por médio Parnaíba e médio Pindaré, e outro endêmico do médio Pindaré. Os haplótipos do médio Parnaíba formam um agrupamento em forma de estrela em uma das pontas da rede. Neste agrupamento, que também inclui dois haplótipos do baixo Parnaíba, H23 é o haplótipo central.

Quatro haplótipos do baixo Parnaíba separam-se desse grupo por cinco passos mutacionais, conectando o Clado Parnaíba ao conjunto de haplótipos do Tocantins e Turiaçu (Clado Tocantins).

O terceiro grupo, composto por representantes do Turiaçu e Tocantins, é mais difícil de definir, pois formam dois subgrupos. O subgrupo 1 está localizado a meio caminho entre os grupos Mearim e Parnaíba. Este subgrupo é caracterizado, principalmente, pela maior frequência de haplótipos do rio Turiaçu, sendo H30 o mais frequente e que também está presente no baixo Itapecuru. O subgrupo 2 é mais próximo do grupo Parnaíba, apresentando maior frequência de haplótipos do Tocantins, com um haplótipo comum a Tocantins e Turiaçu (Figura 4-5).

4.3.1.3 NCA

A estrutura filogenética apresentada nas árvores e na rede de haplótipos resultou em seis níveis de agrupamento para a NCA (Figura 4-6). Em sete clados, detectaram-se associação geográfica com algum valor significativo para os parâmetros D_n e D_c (Tabela 4-6). No menor nível de agrupamento (I-8), indicando as relações recentes entre os haplótipos, foi inferido fluxo gênico restrito com isolamento por distância, envolvendo todos os rios amostrados, exceto Parnaíba.

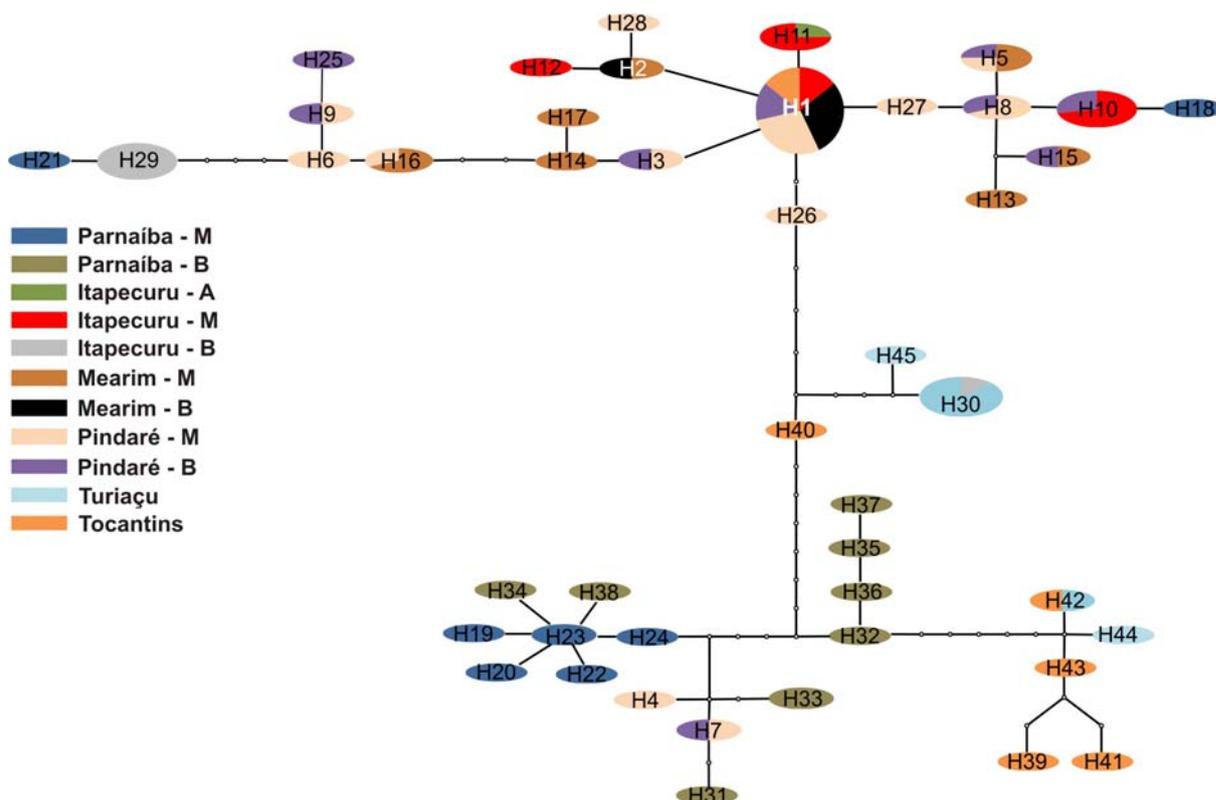


Figura 4-5. Rede de haplótipos das populações de *Prochilodus lacustris*, gerada pelo método de Parcimônia Estatística aplicado sobre um conjunto de seqüências da região controle do DNAm. A = alto; B = baixo; M = médio, em referência aos diferentes trechos dos rios.

Dois eventos, colonização por longa distância e expansão de área contígua, foram inferidos nas regiões da rede onde os haplótipos do Parnaíba se conectam com aqueles do clado Mearim. No clado Parnaíba, fluxo gênico restrito com isolamento por distância foi associado com haplótipos do Parnaíba e médio Pindaré (clado IV-3), ao passo que um evento de fragmentação foi detectado envolvendo o baixo Parnaíba e o clado Tocantins (clado IV-4). Em um nível de agrupamento maior, colonização de longa distância possivelmente acoplada com fragmentação subsequente foi inferida entre os clados Parnaíba e Tocantins (clado V-2).

No maior nível de agrupamento (Cladograma Total) foi identificado fluxo gênico restrito/dispersão, mas com alguma dispersão de longa distância, correspondendo ao evento mais antigo para definição das relações entre os haplótipos.

Tabela 4-6. Clados com associação geográfica significativa detectados pela análise dos clados aninhados (NCA) sobre as sequências da região controle do DNAm de *P. lacustris*. A = alto, B = baixo e M = médio, em referência aos trechos dos rios.

Clado	Áreas envolvidas	Inferência
I-8	Todas, exceto Parnaíba	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
II-5	Parnaíba (M), Itapecuru (M), Mearim (M), Pindaré (B, M)	Colonização por longa distância
IV-1	Parnaíba (M), Itapecuru (M), Mearim (M), Pindaré (B, M)	Expansão de área contígua
IV-3	Parnaíba (M, B), Pindaré (M)	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
IV-4	Parnaíba (B), Tocantins, Turiaçu	Fragmentação passada
V-2	Parnaíba (M, B), Pindaré (M), Tocantins, Turiaçu	Colonização de longa distância, possivelmente acoplada com fragmentação subsequente
Total	Todas	Fluxo gênico restrito/dispersão, mas com alguma dispersão de longa distância

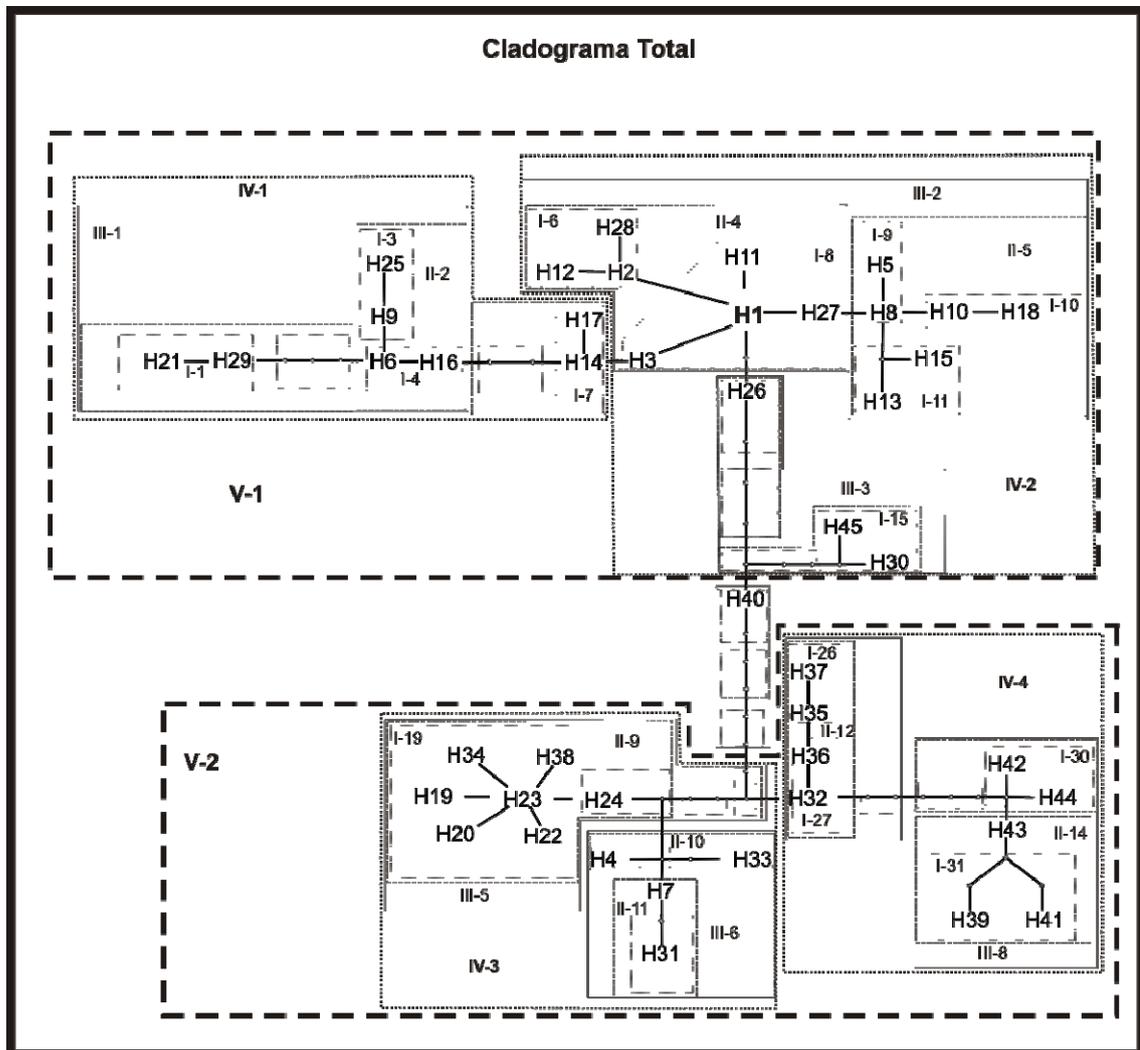


Figura 4-6. Rede de máxima parcimônia para os haplótipos de *P. lacustris*, obtidos com base em seqüências da região controle do DNAm_t, e a configuração utilizada para a análise dos cladogramas aninhados (NCA). Cada linha na rede representa uma mudança em um passo mutacional. Um círculo indica um nodo interno que não estava presente na amostra.

4.3.1.4 Relógio molecular

Os testes RRT e LRT (LRT = 9,246; $P > 0,05$) indicaram que as taxas de substituição são homogêneas entre os três clados identificados nas árvores haplotípicas: Mearim, Tocantins e Parnaíba (Tabela 4-7). A taxa de divergência estimada foi de $0,39 \pm 0,11 \times 10^{-8}$.

Tabela 4-7. Resultados do teste RRT para avaliação da homogeneidade das taxas de substituição entre os clados Mearim, Tocantins e Parnaíba.

Clado	ΔK	d.p.	P
Mearim X Parnaíba	0,007	0,005	0,132
Mearim X Tocantins	0,005	0,005	0,323
Parnaíba X Tocantins	0,002	0,004	0,674

Os dois métodos utilizados para estimar os tempos de divergências entre os haplótipos produziram valores similares para os diferentes nós das árvores (Tabela 4-8 Tabela 4-9, Figura 4-7). O tempo médio de divergência entre os haplótipos de *P. lacustris* e *P. nigricans* foi estimado entre $2,2 \pm 0,55$ Ma e $2,3 \pm 0,46$ Ma. As linhagens de *P. lacustris* passaram a se diferenciar por volta de $1,3 \pm 0,4$ Ma a $1,6 \pm 0,2$ Ma, quando um conjunto de haplótipos exclusivos do baixo Parnaíba (T2, Figura 4-7) divergiu dos demais. Entre $1,1 \pm 0,4$ Ma e $1,4 \pm 0,2$ Ma ocorreu separação dos ancestrais que deram origem aos haplótipos que formam os clados Parnaíba e Tocantins + Mearim. Este último clado divergiu entre $0,78 \pm 0,27$ Ma e $0,96 \pm 0,15$ Ma. O ancestral comum mais recente (MRCA) do clado Parnaíba foi posicionado em $0,71 \pm 0,26$ Ma a $0,93 \pm 0,2$ Ma, correspondendo ao clado mais antigo. No clado Tocantins o MRCA foi identificado em $0,61 \pm 0,25$ Ma a $0,64 \pm 0,2$ Ma (T18) ou $0,55 \pm 0,3$ Ma (T17), ao passo que no clado Mearim o MRCA foi estimado entre $0,65 \pm 0,1$ Ma e $0,70 \pm 0,24$ Ma (T6).

Os menores tempos de divergência estimados dentro dos clados Mearim, Tocantins e Parnaíba foram, respectivamente: $0,09 \pm 0,08$ Ma a $0,12 \pm 0,07$ Ma (H21 – H29), $0,22 \pm 0,12$ Ma a $0,27 \pm 0,19$ Ma (H39 – H43) e $0,09 \pm 0,08$ Ma a $0,12 \pm 0,06$ Ma (H20 – H22).

Tabela 4-8. Tempos de divergência (anos) das sequências da região controle do DNAm de *P. lacustris*, estimados através de análise Bayesiana usando coalescência sem especificar ponto de calibração na árvore.

Nó	Média	desvio padrão	Intervalo de confiança
T1	2.300.400	463.600	(1.637.200 - 3.456.800)
T2	1.646.800	248.400	(1.217.200 - 2.182.400)
T3	1.483.200	232.400	(1.078.400 - 2.000.800)
T4	1.264.000	210.800	(892.800 - 1.730.000)
T5	956.000	153.600	(678.800 - 1.274.800)
T6	646.400	102.400	(466.000 - 858.400)
T7	613.600	96.000	(443.600 - 813.200)
T8	572.400	90.400	(409.200 - 758.800)
T9	511.200	92.800	(332.400 - 698.800)
T10	409.200	98.000	(213.200 - 601.600)
T11	285.600	91.200	(112.400 - 465.600)
T12	151.600	76.800	(28.000 - 320.400)
T13	259.600	126.000	(48.000 - 517.600)
T14	304.800	96.000	(133.600 - 502.400)
T15	232.800	88.400	(81.200 - 422.400)
T16	117.600	67.200	(19.600 - 276.800)
T17	551.200	258.800	(94.800 - 1.027.200)
T18	643.200	198.800	(296.400 - 1.062.800)
T19	330.400	131.200	(112.000 - 614.000)
T20	219.600	117.600	(41.200 - 476.000)
T21	932.000	202.800	(557.600 - 1.364.400)
T22	720.000	158.400	(431.200 - 1.049.600)
T23	363.600	170.400	(78.400 - 732.400)
T24	506.000	130.400	(282.000 - 782.400)
T25	367.600	100.400	(192.400 - 592.000)
T26	299.200	86.400	(150.000 - 502.800)
T27	240.000	78.400	(112.400 - 409.600)
T28	180.400	72.000	(63.600 - 343.600)
T29	116.400	64.400	(20.800 - 270.400)
T30	498.800	213.600	(170.800 - 995.200)
T31	206.000	124.800	(32.000 - 510.800)

Tabela 4-9. Tempos de divergência (anos) das sequências da região controle do DNAm de *P. lacustris*, estimados através de análise Bayesiana usando *soft bounds*.

	Média	dp	Intervalo de confiança
T1	2.216.430	545.539	(1.130.000 - 3.010.000)
T2	1.256.187	438.008	(570.000 - 2.270.000)
T3	1.118.682	396.864	(500.000 - 2.040.000)
T4	842.342	289.838	(380.000 - 1.520.000)
T5	784.605	269.683	(360.000 - 1.420.000)
T6	703.363	244.687	(320.000 - 1.280.000)
T7	649.269	228.914	(290.000 - 1.190.000)
T8	592.765	212.633	(260.000 - 1.090.000)
T9	473.316	189.422	(180.000 - 920.000)
T10	392.569	171.822	(130.000 - 800.000)
T11	304.075	151.352	(80.000 - 660.000)
T12	154.045	111.788	(10.000 - 430.000)
T13	146.269	132.825	(10.000 - 490.000)
T14	387.144	175.564	(120.000 - 800.000)
T15	246.160	145.086	(40.000 - 600.000)
T16	87.741	82.676	(0 - 310.000)
T17	528.596	221.930	(170.000 - 1.050.000)
T18	610.101	248.574	(230.000 - 1.190.000)
T19	437.430	216.196	(110.000 - 940.000)
T20	267.375	192.183	(10.000 - 740.000)
T21	712.917	257.742	(320.000 - 1.330.000)
T22	604.303	223.110	(260.000 - 1.140.000)
T23	389.580	174.055	(80.000 - 770.000)
T24	484.359	194.023	(190.000 - 950.000)
T25	385.148	162.927	(140.000 - 780.000)
T26	317.947	142.730	(110.000 - 660.000)
T27	252.920	125.418	(70.000 - 560.000)
T28	169.137	104.812	(20.000 - 430.000)
T29	98.151	81.672	(0 - 320.000)
T30	609.250	291.231	(170.000 - 1.300.000)
T31	187.405	152.045	(10.000 - 580.000)

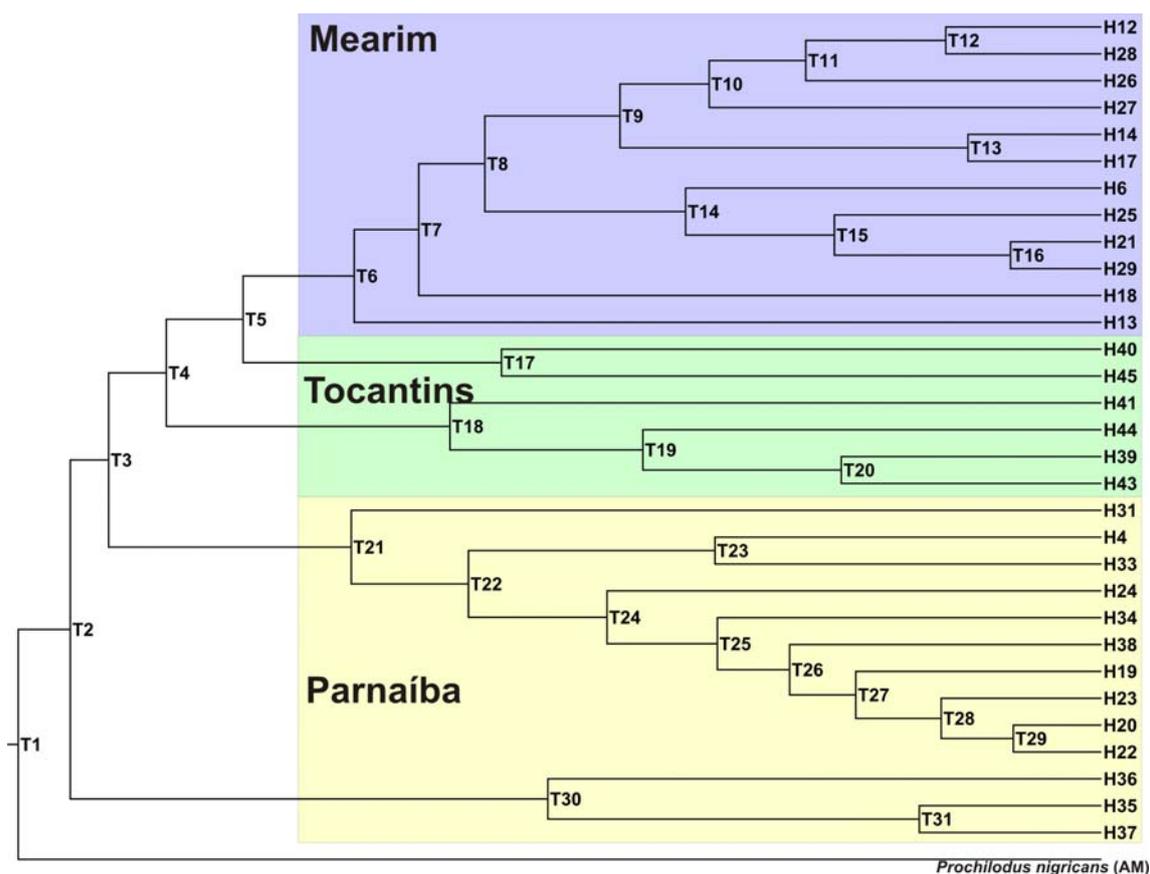


Figura 4-7. Árvore linearizada indicando os tempos de divergências, descritos no texto, das sequências da região controle do DNAmT de *P. lacustris*.

4.3.2 Íntron 1 do gene S7

4.3.2.1 Diferenciação genética

A análise das sequências do íntron 1 do gene S7 de 79 indivíduos de *Prochilodus lacustris* permitiu a identificação de 8 haplótipos, definidos por 10 sítios polimórficos. O modelo de evolução molecular que melhor se ajustou ao conjunto de dados foi HKY, com taxa transição/transversão igual a 1,39. Este modelo foi selecionado pelo programa JModeltest (POSADA, 2008), utilizando os critérios AICc e BIC que produziram pesos 0,505 e 0,6052, respectivamente, para o modelo escolhido.

A análise gráfica do nível de saturação das sequências revelou que nenhum dos tipos de substituição (transição e transversão) apresentou saturação (Figura 4-8).

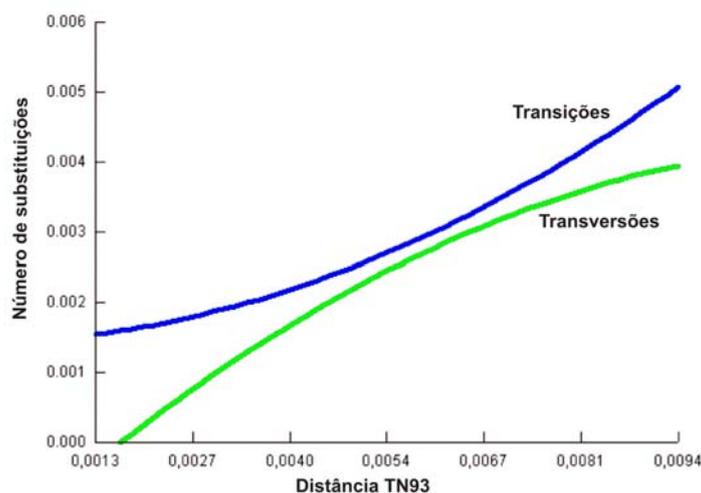


Figura 4-8. Nível de saturação das transições e transversões no conjunto de dados do íntron 1 do gene S7, avaliado pela distância Tamura-Nei (1993).

A variação genética nos sítios amostrados apresentou baixa diversidade haplotípica ($H=0,24$) e baixa diversidade nucleotídica ($\pi = 0,0009$). Os maiores valores de H foram observados nos rios Tocantins e Turiaçu, ao passo que o valor mais baixo para esse índice foi obtido na população do rio Pindaré. Tocantins e Turiaçu também apresentaram os maiores valores de diversidade nucleotídica, enquanto que os menores valores foram observados nas demais populações amostradas (Tabela 4-10). Os valores de Θ , estimados a partir do número de sítios segregantes (Θ_s) e da diversidade nucleotídica ($\Theta\pi$), foram maiores no rio Tocantins. Os menores valores de Θ_s e $\Theta\pi$ foram observados nos rios Itapecuru e Parnaíba, respectivamente.

Tabela 4-10. Características moleculares de *Prochilodus lacustris* com base em sequências do íntron 1 do gene S7.

	Parnaíba	Itapecuru	Mearim	Pindaré	Turiaçu	Tocantins	Total
Indivíduos	25	9	12	25	6	2	79
Haplótipos	3	2	1	3	2	2	8
Theta S	1,06 ± 0,6	0,74 ± 0,56	0	1,59 ± 0,8	0,88 ± 0,68	2,00 ± 1,73	2,024 ± 0,8
Theta pi	0,39 ± 0,42	0,44 ± 0,49	0	0,48 ± 0,48	1,07 ± 0,94	2,00 ± 2,45	0,62 ± 0,55
H (diversidade haplotípica)	0,23 ± 0,11	0,22 ± 0,17	0	0,16 ± 0,09	0,53 ± 0,17	1,00 ± 0,5	0,24 ± 0,06
π (diversidade nucleotídica)	0,0006 ± 0,0007	0,0007 ± 0,0007	0	0,0007 ± 0,0007	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,003	0,0009 ± 0,0008
D de Tajima	-1,69	-1,36	0	-2,09	1,03	0,00	-1,84
P(D)	0,02	0,09	0	0,00	0,87	1,00	0,01
Fs de Fu	-0,51	0,67	0	-0,14	1,72	0,69	-4,45
P(Fs)	0,23	0,46	0	0,36	0,76	0,38	0,01

O teste D de Tajima indicou desvios significantes da hipótese de neutralidade para Parnaíba, Pindaré e para o conjunto de amostras, tomadas como uma única população. O teste Fs de Fu, por outro lado, foi significativo apenas para o conjunto de todas as amostras agrupadas (Tabela 4-10). Assim, uma análise de *mismatch distribution* foi aplicada apenas para Parnaíba, Pindaré e para o conjunto de todas as amostras.

Os resultados dessa análise não indicaram expansões demográficas para nenhum grupo. Para todos os grupos, a distribuição de frequência das diferenças observadas entre os pares de sequências segue um padrão multimodal, típico de populações estacionárias (EXCOFFIER *et al.*, 2005), não ocorrendo ajuste significativo com o modelo esperado de expansão súbita (P_{SSD} e $P_r > 0,05$) (Figura 4-9).

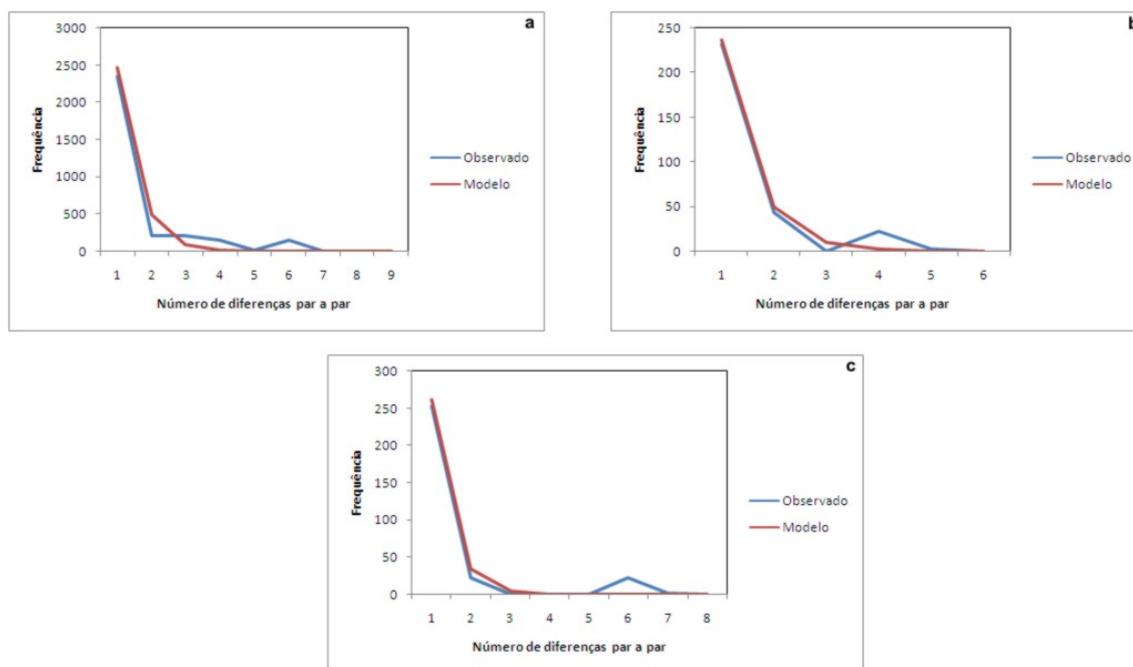


Figura 4-9. Distribuição mismatch com base em sequências do íntron S7 para: a) uma população com todas as amostras, b) Parnaíba e c) Pindaré.

As divergências genéticas entre as populações foram menores do que as obtidas a partir das sequências da região controle, sendo menores do que 0,1% entre todos os pares comparados, exceto Tocantins (Tabela 4-11). A divergência par-a-par entre Tocantins e as demais localidades variou de 2,8% (Tocantins X Parnaíba) a 3,2% (Tocantins X Turiaçu).

Tabela 4-11. Divergência genética par a par entre as populações de *Prochilodus lacustris* com base em sequências do íntron S7. Valores abaixo da diagonal são diferenças entre grupos. Valores na diagonal são diferenças dentro dos grupos.

	Mearim	Pindaré	Itapecuru	Parnaíba	Turiaçu	Tocantins
Mearim	0,004					
Pindaré	0,000	0,005				
Itapecuru	0,000	0,000	0,000			
Parnaíba	0,000	0,000	0,000	0,005		
Turiaçu	0,001	0,000	0,001	0,001	0,011	
Tocantins	0,029	0,031	0,031	0,028	0,032	0,020

De modo geral, as diferenças dentro dos grupos foram maiores do que entre grupos. Os maiores valores foram obtidos para Tocantins (2%) e Turiaçu (1,1%), enquanto

que nas demais populações a divergência entre os haplótipos dentro de cada grupo atingiu, no máximo, 0,05%.

A AMOVA, aplicada sobre o conjunto de dados do íntron S7, apresentou resultado similar às sequências da região controle, indicando alta estruturação na amostra ($\Phi_{st} = 0,35$), com a maior parte da variação acumulada no componente dentro (Tabela 4-12).

Tabela 4-12. Resultados da AMOVA para as populações de *Prochilodus lacustris*, com base nas sequências do íntron S7. Va = variação entre populações; Vb = variação dentro de populações.

Fonte de Variação	g.l.	SSQ	Componente da variância	Porcentagem de Variação
Va	5	8,30	0,12	35,26%
Vb	73	16,12	0,22	64,74%
Total	78	24,42	0,34	
Φ_{st}		0,35		
P(Φ_{st})		< 0,001		

Os valores de Φ_{ST} par a par foram significantes entre todos os pares de populações quando comparadas com o Tocantins (Tabela 4-13). Valores significantes para esse parâmetro também foram obtidos entre Turiaçu e as demais localidades, exceto Itapecuru. As comparações par a par de N_{fm} foram altas nos pares envolvendo Parnaíba, Itapecuru, Mearim e Pindaré, enquanto que os baixos valores obtidos para Turiaçu e Tocantins indicam pouco fluxo gênico entre estas populações e as demais (Tabela 4-13).

Tabela 4-13. Comparação par a par dos valores de Φ_{ST} (abaixo da diagonal) e N_{fm} (acima da diagonal) entre as localidades amostradas de *P. lacustris*, com base nas sequências do íntron S7.

	Parnaíba	Itapecuru	Mearim	Pindaré	Turiaçu	Tocantins
Parnaíba	-	37,64	-24,68	-69,47	1,40	0,07
Itapecuru	0,01ns	-	14,40	-218,84	90,08	0,09
Mearim	-0,02ns	0,03ns	-	-15,26	0,92	0,02
Pindaré	-0,01ns	0,00ns	-0,03ns	-	1,69	0,09
Turiaçu	0,26*	0,01ns	0,35*	0,23*	-	0,18
Tocantins	0,88*	0,85*	0,95*	0,85*	0,73*	-

* $P < 0,05$; ns – não significante

4.3.2.2 Padrões de relações entre os haplótipos

Na árvore MV apenas um clado apresentou elevado valor de *bootstrap*, agrupando haplótipos do Parnaíba, Tocantins e Pindaré (Figura 4-10). Neste clado, os haplótipos do Tocantins (H2 e H7) são mais próximos do Pindaré (H5) do que Parnaíba (H3). Para os demais clados foram associados baixos valores de *bootstrap*. Entretanto, chama atenção a posição basal dos haplótipos compartilhados entre as áreas (H1 e H6) e a divergência de H4, um haplótipo do rio Parnaíba, em relação a toda a árvore.

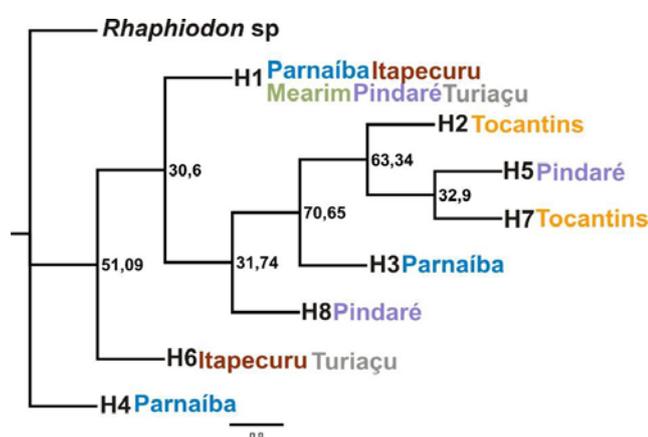


Figura 4-10. Árvore haplotípica de *Prochilodus lacustris*, gerada pelo método de Máxima Verossimilhança aplicado sobre um conjunto de sequências do íntron S7.

A topologia gerada pelo método de agrupamento de vizinhos foi ligeiramente diferente da árvore MV (Figura 4-11). Apesar de baixo suporte, dois agrupamentos podem ser identificados. Um clado composto por haplótipos do Pindaré, Tocantins e Parnaíba, repetindo o agrupamento observado na árvore MV. O segundo clado é formado pelos haplótipos compartilhados (H1 e H6) e um haplótipo do Pindaré (H8), tendo H4 (Parnaíba) como grupo-irmão na árvore MP, ou sem posição definida na árvore NJ.

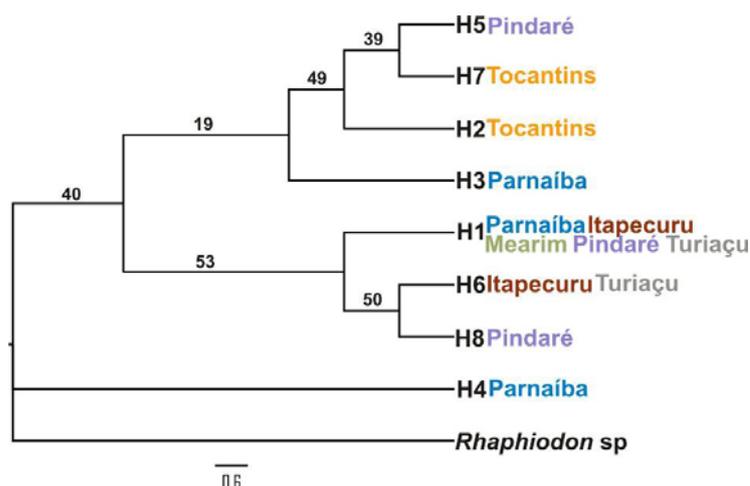


Figura 4-11. Árvore haplotípica de *Prochilodus lacustris*, gerada pelo método de Agrupamento de Vizinhos (NJ) aplicado sobre um conjunto de sequências do íntron S7.

O clado formado pelos haplótipos H2, H3, H5 e H7, dos rios Parnaíba, Pindaré e Tocantins, identificado pelos métodos anteriores, também aparece destacado na rede de haplótipos gerada por parcimônia estatística (Figura 4-12). Nesta rede, o haplótipo H1, compartilhado por todas as localidades, exceto Tocantins, foi o de maior peso de *outgroup* e, por isso, é o haplótipo basal de toda a rede. Como já evidenciado anteriormente, o haplótipo H4 (Parnaíba) foi o mais distante, separado por oito passos mutacionais do haplótipo H1.

4.3.2.3 NCA

A estrutura filogenética apresentada nas árvores e na rede de haplótipos resultou em três níveis de agrupamento para a NCA (Figura 4-13). Associação geográfica com algum valor significativo para os parâmetros Dn e Dc foi detectada apenas no cladograma total, onde foi possível inferir que a distribuição geográfica dos haplótipos do íntron S7 é resultado de fluxo gênico restrito com alguma dispersão de longa distância.

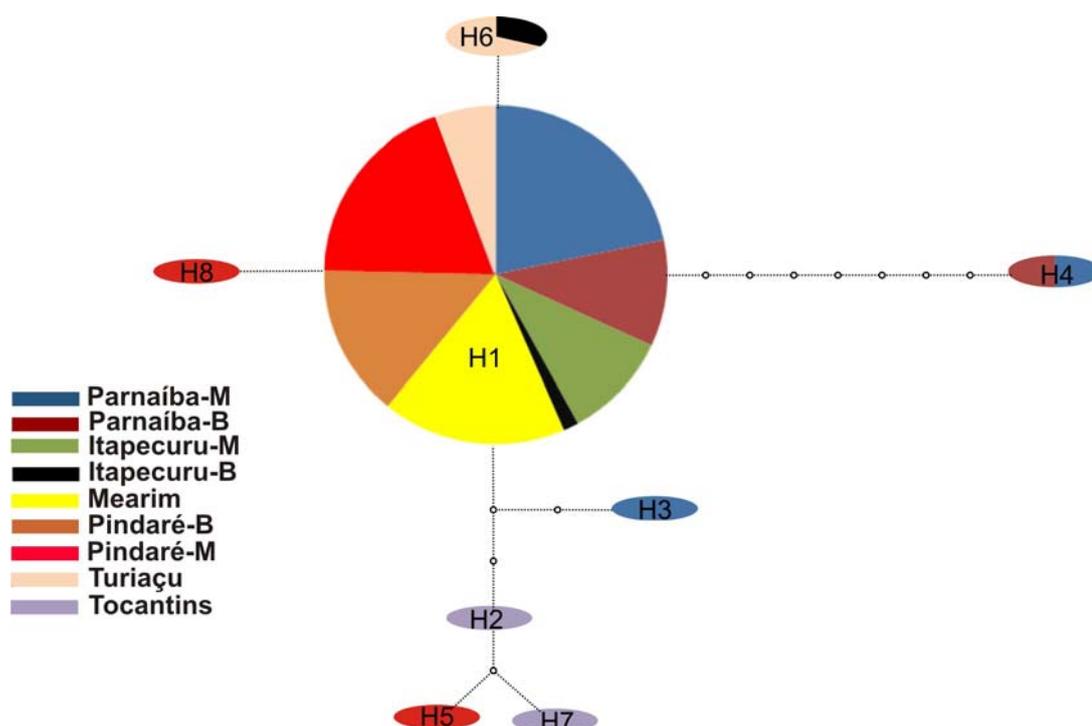


Figura 4-12. Rede de haplótipos das populações de *Prochilodus lacustris*, gerada pelo método de Parcimônia Estatística aplicado sobre um conjunto de sequências do íntron S7. A = alto; B = baixo; M = médio, em referência aos diferentes trechos dos rios.

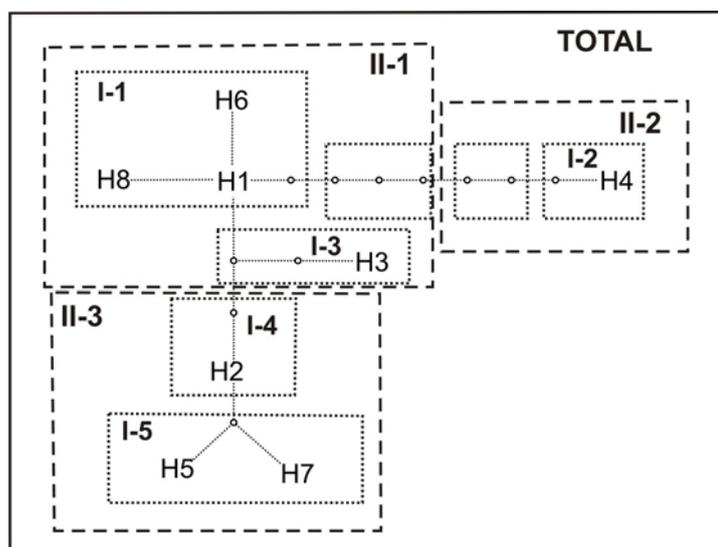


Figura 4-13. Rede de máxima parcimônia para os haplótipos de *P. lacustris*, obtidos com base em sequências do íntron S7, e a configuração utilizada para a análise dos cladogramas aninhados (NCA). Cada linha na rede representa uma mudança em um passo mutacional. Um círculo indica um nodo interno que não estava presente na amostra.

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Diversidade genética e consequências taxonômicas

As espécies de *Prochilodus* são conhecidas por seu comportamento migratório, realizando longos deslocamentos associados com alimentação e reprodução (GOULDING, 1981). Em peixes com essas características são esperados altos níveis de variabilidade genética (LASSALA & RENESTO, 2007; SANTOS *et al.*, 2007) e de fluxo gênico (p.ex. BATISTA *et al.*, 2005; VERGARA *et al.*, 2008), apesar de que as variações neste último parâmetro não estão necessariamente atreladas à mobilidade de uma espécie, podendo ser influenciado por vários fatores como, por exemplo, preferências por habitat e eventos demográficos históricos (AVISE, 2004).

A análise dos índices de diversidade indicou que *P. lacustris* é uma espécie com alta variabilidade genética. De modo geral os maiores valores desses índices foram obtidos para o Rio Tocantins. Considerando os rios exclusivamente maranhenses, observou-se que Parnaíba abriga a população com maior variabilidade, quando analisada a partir dos dados gerados usando o marcador mitocondrial. As sequências do íntron do gene S7, por sua vez, apresentaram pouca variabilidade na amostra.

Os valores de Φ_{ST} e N_{fm} nas comparações par a par também produziram resultados distintos, dependendo do marcador genético considerado. A análise desses parâmetros usando as sequências da região controle do DNAm apontam para uma elevada estruturação na amostra, com reduzido fluxo gênico entre as populações. Por outro lado, a análise das sequências do íntron do gene S7 não foi capaz de identificar estruturação entre os rios Parnaíba, Itapecuru, Mearim e Pindaré.

As diferenças observadas quanto à variabilidade detectada por cada marcador podem estar associadas às características evolutivas de cada região genômica. Maior

variabilidade genética é usualmente esperada em marcadores mitocondriais devido ao seu tamanho compacto, herança maternal predominante e rápida taxa evolutiva (WILSON *et al.*, 1985; MEYER, 1993; BAZIN *et al.*, 2006). Dentro do DNAm, a região controle é a que apresenta maior taxa de substituição de bases, sendo apropriada para responder questões filogenéticas intraespecíficas (LEE *et al.*, 1995; FAUVELOT *et al.*, 2003). Turner *et al.* (2004), por exemplo, observaram que diferenças nas taxas mutacionais das regiões mitocondriais ND4 e COI influenciaram os níveis de variação detectados dentro de linhagens de prochilodontídeos.

Similarmente, diferenças nas taxas mutacionais dos marcadores utilizados podem ter influenciado as inferências sobre fluxo gênico entre as populações. No presente estudo, a região controle do DNAm foi muito variável com uma taxa de mutação de $0,39 \times 10^{-8}$, ao passo que o íntron apresentou taxa de $0,058 \times 10^{-8}$. Isso significa que o íntron evoluiu cerca de sete vezes mais lento do que o marcador mitocondrial. Dessa forma, o padrão gerado pelas sequências nucleares representa apenas os eventos mais antigos dentro das populações estudadas. Essa hipótese é suportada pelos resultados da NCA aplicada sobre os dados nucleares. A análise detectou fluxo gênico restrito com alguma dispersão de longa distância apenas no cladograma total, que representa as relações mais antigas entre as sequências analisadas (TEMPLETON, 2006).

Um padrão comum gerado pelos dois marcadores quanto aos valores de Φ_{ST} e $N_f m$ é o de que as populações do Tocantins e Turiaçu são bastante diferenciadas das demais.

Os padrões discutidos acima foram replicados nas árvores haplotípicas, onde três clados foram identificados com o marcador mitocondrial e uma topologia de árvore esperada para grupos com fluxo gênico intenso (HEY & MACHADO, 2003) foi obtida com o marcador nuclear.

A elevada estrutura na amostra detectada pelo marcador mitocondrial, indicando pequeno fluxo gênico entre as populações de *P. lacustris* dos diferentes rios da região, é conflitante com os resultados obtidos para populações de *Prochilodus* de outras drenagens da América do Sul. No Alto Paraná, um estudo usando aloenzimas indicou altos níveis de variação genética em *P. lineatus*, mas não foi capaz de detectar estrutura populacional (REVALDAVES *et al.*, 1997). Resultados similares foram obtidos por Sivasundar *et al.* (2001) usando sequências de ATPase e da região controle do DNAm de *P. lineatus* da mesma região. No norte da América do Sul, análises de amostras de *P. marie* e *P. rubrotaeniatus* revelaram baixos níveis de diversidade genética em populações dos rios Negro e Orinoco (TURNER *et al.*, 2004; MOYER *et al.*, 2005). Por outro lado, subestruturação populacional em uma pequena escala espacial foi observada em *P. argenteus* do Rio São Francisco com diferentes tipos de marcadores (HATANAKA & GALETTI, 2003; HATANAKA *et al.*, 2006), ausente em *P. costatus* da mesma região (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2008).

Estes estudos indicam, portanto, que em *Prochilodus* parece não existir um padrão quanto ao nível de subestruturação das populações analisadas. Aparentemente, tanto populações presentes em drenagens interconectadas quanto aquelas ocorrendo em drenagens isoladas podem apresentar alguma ou nenhuma subestruturação. Por outro lado, os conflitos observados entre os resultados obtidos em diferentes localidades com diferentes espécies podem apenas indicar respostas inerentes de cada população às pressões locais (BAZIN *et al.*, 2006).

As diferenças interpopulacionais observadas fazem lembrar a hipótese de que as espécies de *Prochilodus* geralmente apresentam distribuição disjunta em que cada drenagem parece abrigar uma espécie distinta (SIVASUNDAR *et al.*, 2001; CASTRO & VARI, 2004). Em um amplo estudo que incluiu a revisão da família Prochilodontidae, Castro

& Vari (2004) validaram *P. lacustris*, endêmica para os rios Parnaíba e Mearim. De acordo com os autores, a espécie é diferenciada de suas congêneres pela presença de pigmentação característica na nadadeira caudal, escamas com subdivisões cruciformes pouco elaboradas e maior número de fileiras horizontais de escamas entre a origem da nadadeira pélvica e a linha lateral.

É notório observar que no conjunto de amostras analisadas ocorrem haplótipos do Rio Tocantins. A espécie reconhecida por Castro & Vari (2004) para essa drenagem é *P. nigricans*, compartilhada com os rios amazônicos. No entanto, observa-se que os haplótipos do Tocantins apresentaram o mesmo nível de divergência em relação a *P. nigricans* que os haplótipos dos demais rios maranhenses. Além disso, as topologias apresentadas nas árvores gênicas revelaram que os haplótipos do Tocantins têm seus parentes mais próximos no Turiaçu e no conjunto Itapecuru + Mearim + Pindaré. Assim, é provável que *P. lacustris* não seja uma espécie exclusiva dos rios Mearim e Parnaíba, mas que também ocorra em simpatria com *P. nigricans* no Rio Tocantins.

A ocorrência de espécies simpátricas de *Prochilodus* em drenagens sul americanas é conhecida para o Rio São Francisco (*P. argenteus*, *P. costatus* e *P. vimboides*), Rio Paraná (*P. lineatus* e *P. vimboides*) e Rio Orinoco (*P. mariae* e *P. rubrotaeniatus*) (CASTRO & VARI, 2003, 2004; TURNER *et al.*, 2004). Por outro lado, análises moleculares de *P. rubrotaeniatus* no norte da América do Sul têm sugerido a presença de pelo menos duas espécies crípticas dentro deste táxon (TURNER *et al.*, 2004).

Castro & Vari (2004) ressaltam, ainda, que a falta de registro de uma espécie de *Prochilodus* em uma determinada drenagem não significa necessariamente a ausência desta, mas pode ser efeito de pouco esforço de coleta na região. Também, é provável que a falta de registro de *P. lacustris* no Rio Tocantins tenha sido influenciada pela hipótese “um rio/uma espécie”, induzindo erros de identificação (p.ex. NOMURA, 1984). Uma análise

combinada usando caracteres morfológicos e moleculares poderá elucidar essas questões no futuro.

As divergências genéticas observadas entre *P. nigricans* e as populações de *P. lacustris* foram da mesma magnitude de valores frequentemente observados entre espécies (SIVASUNDAR *et al.*, 2001). Do mesmo modo, as divergências entre as populações de *P. lacustris* são baixas o suficiente para considerá-las como uma unidade taxonômica. Sob esse aspecto, portanto, consideramos *P. lacustris* como uma espécie válida para os rios analisados e sugerimos a ampliação de sua distribuição para o Rio Tocantins.

4.4.2 Filogeografia de *P. lacustris*

Dependendo da abordagem utilizada, os rios do Maranhão podem fazer parte de uma mesma área de endemismo ou de áreas de endemismo distintas. Lundberg *et al.* (1998), por exemplo, separou a região nas áreas da bacia do Rio Parnaíba e rios do Maranhão (Itapecuru a Gurupi). Hubert & Renno (2006), por outro lado, estabeleceram a Unidade Hidrológica Maranhão (UHM), formada pelo conjunto de rios entre o Itapecuru (inclusive) e o Rio Capim no Pará, como uma área de endemismo para peixes. Com exceção de Gery (1969), todas as abordagens posteriores sobre as áreas de endemismos na região tenderam a considerar o Tocantins e os rios do Maranhão como unidades endêmicas distintas (VARI, 1988; LUNDBERG *et al.*, 1998; SRH/MMA, 2005; HUBERT & RENNO, 2006).

As relações haplotípicas observadas em *P. lacustris* sugerem a existência de diferenças importantes dentro da UHM, onde pelo menos duas linhagens mitocondriais foram identificadas: uma para o Rio Parnaíba e outra para os rios Itapecuru, Mearim e Pindaré. Entretanto, o parentesco observado entre Tocantins e Turiaçu indica a existência de uma terceira linhagem, compartilhada entre UHM e Tocantins. Dessa forma, o padrão de

distribuição geográfica de *P. lacustris* não se ajusta aos modelos propostos para áreas de endemismos.

Exemplos de espécies compartilhadas entre essas drenagens são encontrados apenas fora da família Prochilodontidae, tais como, *Pygocentrus nattereri* e *Leporinus friderici* (PIORSKI *et al.*, 2003; SOARES, 2005). Na maioria dos casos, as espécies citadas para essas drenagens são de ampla distribuição em que uma análise taxonômica mais refinada pode revelar diferenças interpopulacionais significativas, exigindo mudanças posteriores na classificação. Esse foi o caso, por exemplo, de *Platydoras costatus* considerada de ampla distribuição e compartilhada por vários rios do norte da América do Sul (SABAJ & FERRARIS, 2003). Um estudo mais detalhado, com análises de exemplares de várias regiões, revelou que *P. costatus* era composta por pelo menos duas espécies, das quais uma era nova para a UHM (PIORSKI *et al.*, 2008).

Um dos principais fatores responsáveis pela especiação da família Prochilodontidae é o isolamento geográfico de drenagens, resultando em grupos monofiléticos (geralmente espécies) restritos a um único sistema hidrológico (SIVASUNDAR *et al.*, 2001; CASTRO & VARI, 2004; TURNER *et al.*, 2004). As populações de *P. lacustris* parecem corroborar esse modelo, compondo “clados” associados à drenagem em que ocorrem. Entretanto, com exceção de alguns subclados, os agrupamentos identificados não podem ser considerados estritamente monofiléticos.

Montoya-Burgos (2003), analisando a biogeografia do gênero *Hypostomus*, estimou o tempo de divergência entre linhagens amazônicas e maranhenses entre 5,5 Ma e 5,3 Ma. No presente trabalho, o relógio molecular mitocondrial indicou que a diferenciação entre essas linhagens (*P. nigricans* e *P. lacustris*) foi mais recente, ocorrendo entre 2,3 Ma e 2,2 Ma.

Montoya-Burgos (2003) e Hubert & Renno (2006) defenderam a hipótese de dispersão costeira para explicar as relações entre as drenagens amazônicas e maranhenses. De acordo com os autores, os eventos de especiação envolvendo essas áreas teriam sido promovidos principalmente pelas variações de nível do mar. Durante as regressões do final do Mioceno, as conexões entre deltas teriam possibilitado a dispersão costeira, interrompida com a elevação subsequente do mar.

Um dos principais problemas desse modelo é explicar de que modo peixes primários de água doce podem se dispersar por áreas com alguma salinidade. Alguns autores têm discutido o papel da variação de nível do mar sobre a dispersão costeira para alguns peixes de água doce. Near *et al.* (2003) propuseram para *Micropterus*, um Centrarchidae norte americano, um modelo de especiação alopátrica para explicar a distribuição das espécies deste gênero em tributários do Golfo do México. De acordo com o modelo, a divergência entre as espécies teria sido moldada pelas flutuações do nível do mar ocorridas no final do Mioceno e Plioceno. Na Austrália, Wong *et al.* (2004) estudaram os padrões de distribuição de *Pseudomugil signifer* (Pseudomugilidae) e sugeriram que variações pleistocênicas do nível do mar teriam contribuído para a fragmentação de populações desta espécie. Beheregaray *et al.* (2002) observaram que nos rios costeiros do sudeste do Brasil ocorreu uma radiação rápida do complexo *Odonthestes perugia* durante as últimas transgressões/regressões marinhas em consequência do estabelecimento de barreiras paralelas à linha de costa. Os padrões biogeográficos observados nesses casos e explicados via dispersão costeira envolvem espécies secundárias de água doce, formação de lagos temporários e drenagens com características geomorfológicas que permitiam a conexão durante as transgressões/regressões marinhas. Esta é uma situação completamente diferente do cenário vislumbrado por Montoya-Burgos (2003) e Hubert & Renno (2006).

Dispersão costeira só é possível em áreas com alguma característica deltáica, tal como acontece na foz do Amazonas onde, durante as regressões, era possível a coalescência de drenagens amazônicas com drenagens do escudo das Guianas. Contudo, Rossetti (2000) não observou a formação de deltas na bacia São Luís, sustentando que as características estuarinas teriam sido mantidas na região durante todo o Mioceno. Eventos de dispersão e, conseqüentemente, o fluxo gênico entre populações são altamente dependentes da arquitetura da drenagem (HUEY *et al.*, 2008). Por exemplo, planícies de inundação tendem a promover a conectividade entre unidades hidrológicas e permitem altos níveis de fluxos gênicos para as espécies que podem explorá-la (BALCOMBE *et al.*, 2007), ao passo que rios com vales profundos raramente transbordarão, levando as populações ao isolamento e subsequente divergência (BURRIDGE *et al.*, 2007). Assim, rotas de dispersão costeira apenas poderiam ser estabelecidas se a arquitetura antiga das drenagens dessem condições para tal.

Em oposição à hipótese de dispersão costeira, propomos que as diferenças ictiofaunísticas entre as drenagens amazônicas e maranhenses tenham sido promovidas por um evento vicariante, protagonizado pela formação da Serra do Tiracambu. A idade aproximada deste evento coincide com a idade estimada para divergência entre linhagens de *Hypostomus* envolvendo drenagens amazônicas e maranhenses (MONTROYA-BURGOS, 2003). A Serra do Tiracambu é o principal divisor de águas no extremo oeste do Maranhão, separando a rede hidrológica do Estado da drenagem do Tocantins (ver Capítulo 1). Esta unidade geomorfológica foi formada durante o Mioceno-Plioceno (ca. 5,3 Ma) (COSTA *et al.*, 1997) e deve ter exercido um papel importante na diferenciação da ictiofauna entre as duas regiões.

Rossetti & Valeriano (2007) identificaram um “delta” na parte baixa do Tocantins que teria existido durante o Plio-Pleistoceno/Pleistoceno (ca. 2,5 a 1,8 Ma). Essa datação coincide aproximadamente com os dados obtidos para a diferenciação entre *P.*

nigricans e *P. lacustris*. A presença de um delta na altura de Tucuruí pode, durante sua existência, ter contribuído para a dispersão de peixes para as drenagens do Maranhão. Através do delta, o Rio Gurupi, situado a oeste da Serra do Tiracambu, pode ter permanecido em contato com afluentes do Tocantins até que o curso inferior deste fosse capturado para a formação da Baía de Marajó no final do Pleistoceno (VITAL & STATTEGGER, 2000; COSTA *et al.*, 2001, 2002).

Simulações da linha de costa sobre o relevo atual (Capítulo 1) sugerem que durante o Plioceno médio (ca. 3 Ma) a elevação do nível do mar teria inundado todo o trecho médio e baixo do Rio Turiaçu. Durante as transgressões os rios tendem a ficar represados. Uma vez que estes são períodos de grande umidade, os efeitos do represamento podem ser mais acentuados nos rios de baixa energia e com tendência a formar meandros (MONTEIRO & SILVA, 1979). Nos cursos com essas características, tal como nos rios Mearim e Turiaçu, a elevação do nível do mar, associado às chuvas, pode ter induzido o aumento no volume do rio promovendo, assim, transbordamento e aumento da área da planície de inundação. Em consequência, esses processos teriam contribuído para alargamento do vale do rio e, pela redução lateral dos interflúvios dos seus afluentes, ter possibilitado a comunicação temporária entre diferentes drenagens. Dessa forma, a pequena distância entre afluentes do Gurupi e Turiaçu permite postular que esta poderia atuar como uma “via” de dispersão para os peixes entre as duas bacias durante as transgressões. Ao contrário da dispersão costeira, os registros geológicos indicam que eventos vicariantes e dispersão através das partes médio/alta dos rios mais a oeste no Estado do Maranhão é a hipótese mais provável para explicar a diferenciação da ictiofauna em relação à Amazônia.

Dentro de *P. lacustris*, as divergências são mais recentes, variando de 1,6 Ma a 0,12 Ma. As estimativas de tempos de divergências intraespecíficas são similares às obtidas

em outras populações de *Prochilodus* (SIVASUNDAR *et al.*, 2001; TURNER *et al.*, 2004) e podem ter sido influenciadas principalmente por flutuações no nível do mar.

Tradicionalmente, os índices básicos de diversidade genética são utilizados como ferramentas para descrição da variação genética em um grupo, mas podem ser indicadores preliminares do tempo associado com a evolução de um determinado haplótipo (NEI & KUMAR, 2000). Estudos recentes têm mostrado que a diversidade genética no DNAmT de vários organismos está principalmente associada com a taxa de mutação (BAZIN *et al.*, 2006; HELLEGREN, 2009). Dessa forma, baixos valores de diversidade nucleotídica ou altos valores de diversidade haplotípica podem fornecer indícios de evolução recente.

Do mesmo modo, o parâmetro Θ é uma medida de diversidade, geralmente interpretado como uma medida da taxa de mutação neutra por sítio ou como a proporção de sítios polimórficos em uma população (FELSENSTEIN, 2006; CARLING & BRUMFIEL, 2007). Tomando por base esses preceitos, observa-se que os maiores valores de diversidade genética foram obtidos para os rios Parnaíba e Tocantins. Estas correspondem às drenagens mais extensas e mais antigas da região, podendo, conseqüentemente, abrigar o conjunto de haplótipos mais antigo de *P. lacustris*.

Os tempos de divergências estimados para as populações de *P. lacustris* coincidem com a idade de eventos geológicos e de flutuações marinhas Plio-Pleistocênicos. A diferenciação mais antiga dos haplótipos do Parnaíba sugere que as populações mais a leste tenderam a se isolar das demais entre 1,6 Ma e 1,5 Ma. A sequência de eventos inferidos pela NCA – fluxo gênico restrito (cladograma total), colonização com fragmentação subsequente (clado V-2) e fragmentação passada (clado IV-4) – sugere que as diferenças entre Parnaíba e as demais drenagens começaram a ser implementadas durante o Ciclo Velhas. Este evento geológico foi caracterizado por aplainamento da região central do Estado, produzindo as depressões intermontanas dos altos cursos. O Ciclo Velhas pode ter continuado até o

Pleistoceno e deve ter contribuído para a modelagem da configuração atual dos trechos baixos dos rios Pindaré, Mearim e Itapecuru, que se “afunilam” em direção ao Golfão Maranhense.

Reativações de falhas associadas às estruturas do Arco Urbano Santos durante o Quaternário (VEIGA JR & OLIVEIRA, 2000) também podem ter contribuído para a consolidação das diferenças entre as drenagens consideradas.

De acordo com o relógio molecular mitocondrial, a separação entre [Tocantins + Turiaçu] e [Mearim + Pindaré + Itapecuru] teria ocorrido entre 1,2 Ma e 0,96 Ma. A evolução do Golfão Maranhense, iniciado no Plioceno e concluída no final do Pleistoceno (AB’SABER, 1960; PETRI & FÚLFARO, 1983), teria sido um dos eventos vicariantes responsáveis pela separação das populações. Costa *et al.* (1997) identificaram um conjunto de falhas no noroeste do Maranhão. A reativação destas durante o Quaternário induziu a captura de segmentos de rios e bloqueou a drenagem, formando o sistema de lagos típico da Baixada Maranhense. Se, por um lado, estes eventos contribuíram para a separação entre [Tocantins + Turiaçu] e [Mearim + Pindaré + Itapecuru], por outro, possibilitaram a comunicação entre os rios Pindaré, Mearim e Itapecuru, que deveria ocorrer através do Golfão Maranhense. Posteriormente, transgressões Pleisto-Holocênicas teriam entrado em ação promovendo a diferenciação de haplótipos nessas drenagens.

É importante notar que o único momento em que a dispersão costeira teria contribuído para a diversificação genética da ictiofauna na região seria através do Golfão Maranhense, envolvendo os rios Mearim, Pindaré e Itapecuru.

Hubert & Renno (2006), baseados na análise de dados de distribuição de Characiformes, se apoiaram na hipótese de Museu para postular a existência de oito áreas de refúgios para peixes de água doce na América do Sul, relacionadas com as incursões marinhas do Mioceno. No nível populacional, este modelo prevê baixa diversidade genética dentro das

áreas de refúgios, diferenciação entre as áreas de refúgios e potencial ausência de diferenciação entre áreas de refúgios e colonizadas (FARIAS & HRBEK, 2008).

Dentre as áreas de refúgios postuladas por Hubert & Renno (2006) encontra-se o trecho médio-alto do Rio Parnaíba. Entretanto, nossos dados não dão suporte à proposta dos autores, pois não satisfazem as previsões do modelo quando aplicado às populações. Se algum refúgio pode ser postulado para a região, este deveria estar localizado no Tocantins e, subsequentemente, colonizado os rios da região central do Estado.

Por outro lado, a maior diversidade associada a essas drenagens e os padrões de relações entre os haplótipos apresentados nas árvores gênicas sugerem que Parnaíba e Tocantins tenham atuado como “populações-fontes” para as drenagens da região central do estado do Maranhão. Isso significaria que os rios Itapecuru, Mearim, Pindaré e Turiaçu correspondem a regiões faunísticas de transição entre Parnaíba e Tocantins. Conclusões similares foram obtidas por Hubert *et al.* (2007), estudando populações de *Serrasalmus rhombeus* dos rios Guaporé e Madeira, em que observaram que os níveis elevados de diversidade do DNAm sugeriam que as linhagens identificadas teriam se originado no refúgio pleistocênico Aripuanã.

Não é possível afirmar, com base nos dados, se a hipótese é válida apenas para níveis populacionais ou se pode ser extrapolada para níveis taxonômicos superiores. Entretanto, as variações marcantes observadas em *Hoplias* (Capítulo 2) e em *P. lacustris* sugerem um processo de especiação em curso nos grupos dessa região.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A rede hidrológica do Estado do Maranhão é composta por três regiões hidrográficas – Tocantins/Araguaia, Atlântico Nordeste Ocidental e Parnaíba – que constituem três ecorregiões aquáticas: Tocantins/Araguaia, Gurupi/Golfão Maranhense e Maranhão/Piauí (SRH/MMA, 2005; MMA, 2006a). Essa configuração, por si só, sugere que alguma diferenciação nos organismos aquáticos da região deve ocorrer, mas que ainda não é completamente compreendida.

Prováveis diferenças entre “unidades populacionais” despontam quando se tenta estabelecer áreas de endemismo incluindo rios do Maranhão, tomando por base principalmente padrões de distribuição geográfica de peixes (p.ex. LUNDBERG *et al.*, 1998; HUBERT & RENNO, 2006). A análise de tais áreas e dos padrões de distribuição permite observar que os rios do Maranhão abrigam um conjunto de espécies endêmicas e, também, várias outras de ampla distribuição compartilhadas entre as áreas vizinhas.

Uma breve análise da lista de espécies citadas para os rios do Maranhão, excluindo o Tocantins, no *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America - CLOFFSCA* (REIS *et al.*, 2003) revela que de um total de 114 espécies, 25 são endêmicas, 60 não endêmicas e 29 espécies têm ocorrência provável na região. É óbvio que a listagem já se encontra defasada diante das novas espécies descritas nos últimos anos (p.ex. STAECK & SCHINDLER, 2006; LUCENA, 2007; PIORSKI *et al.*, 2008). As novas descrições têm sugerido que o número de espécies endêmicas é maior do que o observado atualmente, mas inter-relações com as unidades hidrológicas vizinhas permanecem obscuras. Por exemplo, as espécies *Acestrorhynchus falcatus* e *A. heterolepis*, identificadas pelo prof. Dr. Naércio Menezes do MZUSP, são comumente observadas em rios da região (DOURADO *et al.*, em preparo). No CLOFFSCA, estas espécies são citadas para áreas do norte da América do Sul que incluem os rios Amazonas e Orinoco e rios das Guianas (MENEZES, 2003).

No nível populacional, este é o primeiro trabalho que analisa variações e tenta estimar algumas relações entre espécies do Maranhão e da região Amazônica. Tanto em *Hoplias malabaricus* quanto em *Prochilodus lacustris* foi observada alta variabilidade genética nas amostras estudadas. No entanto, os processos geradores da diversidade genética não foram os mesmos para as duas espécies.

Hoplias malabaricus, por ser uma espécie sedentária (ALMEIDA *et al.*, 1997; SUZUKI *et al.*, 2005), aparentemente teve sua diversidade genética associada com a arquitetura da drenagem. Huey *et al.* (2008), por exemplo, observaram que ambientes com maior variabilidade hidrológica suportam populações com maior diversidade genética em peixes australianos. Do mesmo modo, em *H. malabaricus* os maiores índices de diversidade genética ocorreram em drenagens com cursos meandantes e que formam várias lagoas marginais durante o período de estiagem. Dada a preferência da espécie por ambientes lênticos (SUZUKI & AGOSTINHO, 1997; PETRY *et al.*, 2003), é possível que o isolamento das lagoas, mesmo que temporário, tenha contribuído para a variabilidade observada em *H. malabaricus*.

Prochilodus lacustris, por sua vez, é uma espécie de comportamento migratório intenso (GOULDING, 1981) em que a variabilidade genética parece ter sido mais influenciada por fatores históricos do que arquitetura de drenagem. Com exceção dos rios Mearim e Pindaré, todas as comparações de Φ_{ST} par a par produziram valores significantes com reduzido fluxo gênico entre as populações. Na verdade, os rios Mearim e Pindaré formam um sistema hidrológico, pois as desembocaduras destes confluem pouco antes de chegar ao Golfão Maranhense. Um pouco mais para nordeste, ainda no Golfão Maranhense, desemboca o Rio Itapecuru, com o qual Mearim e Pindaré apresentam um pequeno fluxo gênico, apesar do valor significativo de Φ_{ST} .

Assim, ao contrário de *H. malabaricus*, as populações de *P. lacustris* estão mais restritas às suas drenagens, em que as diferenças observadas refletem os momentos que estas divergiram. Postulou-se no presente trabalho que a baixa resolução dos dados de *H. malabaricus* pode estar relacionada com polimorfismo ancestral e ordenamento aleatório de linhagens ancestrais, retendo padrões polifiléticos ou parafiléticos e obscurecendo a história evolutiva das populações (McMILAN & PALUMBI, 1995; AVISE, 2004). Em *P. lacustris*, por outro lado, a boa resolução das árvores haplotípicas mitocondriais permitiram identificar os principais eventos geológicos que possivelmente resultaram no confinamento das populações dentro de cada drenagem.

Ao invés de adotar uma visão simplista de dispersão costeira (MONTROYA-BURGOS, 2003; HUBERT & RENNO, 2006), indicamos pelo menos quatro eventos vicariantes responsáveis pela diversidade observada em *P. lacustris*: formação da Serra do Tiracambu, formação do “delta” do Tocantins e captura da parte inferior deste para formação da Baía de Marajó, aplainamento da região central do Estado do Maranhão combinado com transgressões marinhas durante o Ciclo Velhas, e estabelecimento do Golfão Maranhense.

Assim, com base nos dados moleculares e na informação geológica disponível, sugerimos que comunicações transitórias entre afluentes das partes médio-alta do Turiaçu com médio-baixa do Gurupi e Tocantins devem ser consideradas como prováveis vias de dispersão antiga entre essas bacias. Isto era possível pelo transbordamento dos rios, represados durante as transgressões marinhas. Concluimos, entretanto, que dispersão costeira apenas foi possível através do Golfão Maranhense, explicando as similaridades observadas entre os rios Mearim, Pindaré e Itapecuru.

Do ponto de vista taxonômico, os resultados obtidos em *H. malabaricus* e *P. lacustris* têm algumas consequências importantes. As análises combinadas de dados moleculares e morfométricos indicaram que na área de estudo há a possibilidade de ocorrerem

pelo menos duas espécies de *Hoplías*. Em *P. lacustris*, por outro lado, os dados não são consistentes com a hipótese de que esta é uma espécie endêmica para os rios Parnaíba e Mearim (CASTRO & VARI, 2004). Nossas análises sugerem que as populações de *P. lacustris* compõem uma unidade taxonômica. Se esta hipótese for confirmada por estudos mais refinados, combinando informações moleculares, morfológicas e morfométricas, então a área de distribuição da espécie deve ser ampliada para o Rio Tocantins.

Portanto, acreditamos que, frente ao conhecimento incipiente da icitiofauna dos rios maranhenses, ainda é prematuro indicar se estes compõem uma ou mais áreas de endemismos. Diante da evolução recente das drenagens e da possibilidade de especiação em curso em alguns grupos da região, é provável que a indicação mais aproximada de áreas de endemismos seja a de ecorregiões definidas pela SRH/MMA (2005).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SÁBER, A. Contribuição a geomorfologia do Estado do Maranhão. **Noticias Geomorfológicas**, v.3, n.5, p.35-44. 1960.
- AGOSTINHO, A.A.; PELICICE, F.M.; GOMES, L.C. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, n.(4, Suppl.), p.1119-1132. 2008.
- ALEXANDER, H.J.; TAYLOR, J.S.; WU, S.S.-T.; BREDEN, F. Parallel evolution and vicariance in the guppy (*Poecilia reticulata*) over multiple spatial and temporal scales. **Evolution**, v.60, n.11, p.2352-2369. 2006.
- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4692-4693. 1997.
- ALMEIDA, V.L.L.D.; HAHN, N.S.; VAZZOLER, A.E.A.D.M. Feeding patterns in five predatory fishes of the high Paraná River floodplain (PR, Brazil). **Ecology of Freshwater Fish**, v.6, p.123-133. 1997.
- ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; FORSBERG, B.R.; VICTORIA, R.; MARTINELLI, L. Energy Sources for Detritivorous Fishes in the Amazon. **Science**, v.234, p.1256-1258. 1986.
- AVISE, J.C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology**, v.7, p.371-379. 1998.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**: Sinauer Associates. 2004. 684 p.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL JR, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p.489-522. 1987.
- AYRES, J.M.C.; CLUTTON-BROCK, T.H. River boundaries and species range size in Amazonian primates. **American Naturalist**, v.140, n.531-537. 1992.
- BALCOMBE, S.R.; BUNN, S.E.; ARTHINGTON, A.; FAWCETT, J.H.; MCKENZIE-SMITH, F.J.; WRIGHT, A. Fish larvae, growth and biomass relationships in an Australian arid zone river: links between floodplains and waterholes. **Freshwater Biology**, v.52, p.2385-2398. 2007.
- BALL, I.R. Nature and formulation of biogeographical hypotheses. **Systematic Zoology**, v.24, p.407-430. 1976.
- BANFORD, H.M.; BERMINGHAM, E.; COLLETTE, B.B. Molecular phylogenetics and biogeography of transisthmian and amphi-Atlantic needlefishes (Belontiidae: Strongylura and Tylosurus): perspectives on New World marine speciation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.31, n.3, p.833-851. 2004.

BARRETO, A.M.F.; BEZERRA, F.H.R.; SUGUIO, K.; TATUMI, S.H.; YEE, M.; PAIVA, R.P.; MUNITA, C.S. Late Pleistocene marine terrace deposits in northeastern Brazil: sea-level change and tectonic implications. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v.179, p.57-69. 2002.

BARRETT, P.J.; ADAMS, C.J.; MCINTOSH, W.C.; SWISHER, C.C.; WILSON, G.S. Geochronological evidence supporting Antarctic deglaciation three million years ago. **Nature**, v.359, p.816-818. 1992.

BATISTA, J.S.; FORMIGA-AQUINO, K.; FARIAS, I.P.; ALVES-GOMES, J.A. Variabilidade genética da dourada e da piramutaba na bacia Amazônica. In: FABRÉ, N.N.; BARTHEM, R.B. (Ed.). **O Manejo da Pesca dos Grandes Bagres Migradores: Piramutaba e Dourada no Eixo Solimões-Amazonas**. Manaus: Edições Pró-Várzea/IBAMA, 2005, p.15-19

BAZIN, E.; GLÉMIN, S.; GALTIER, N. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. **Science**, v.312, p.570-572. 2006.

BEHEREGARAY, L.B.; SUNNUCKS, P.; BRISCOE, D.A. A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.269, p.65-73. 2002.

BEHLING, H. Impact of the Holocene sea-level changes in coastal, eastern and Central Amazonia. **Amazoniana**, v.XVII, n.1/2, p.41-52. 2002.

BEHLING, H.; COSTA, M.L. Studies on Holocene tropical vegetation Mangrove and coast environments in the State of Maranhão NE Brazil. **Quaternary of South America and Antarctic Peninsula**, v.10, n.7, p.93-118. 1997.

BEHLING, H.; COSTA, M.L. Holocene vegetational and coastal environmental changes from the Lago Crispim record in northeastern Pará State, eastern Amazonia. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v.114, p.145-155. 2001.

BERMINGHAM, E.; AVISE, J.C. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. **Genetics**, v.113, p.939-965. 1986.

BERMINGHAM, E.; MORITZ, C. Comparative phylogeography: concepts and applications. **Molecular Ecology**, v.7, p.367-369. 1998.

BERTOLLO, L.A.C.; BORN, G.G.; DERGAM, J.A.; FENOCCHIO, A.S.; MOREIRA-FILHO, O. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v. 8, p.603-613. 2000.

BIZZI, L.A.; SCHOBENHAUS, C.; VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, J.H. **Geologia, Tectônica e Recursos Minerais do Brasil**. Brasília: CPRM – Serviço Geológico do Brasil. 2003. 692 p.

BOOKSTEIN, F.L. **Morphometric tools for landmark data: geometry and biology**: Cambridge University Press. 1991. 435 p.

BORN, G.G.; BERTOLLO, L.A.C. Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish *Hoplias malabaricus*. Cytotypes with $2n = 42$ chromosomes. **Genetica**, v.110, p.1–9. 2001.

BOWEN, S.H.; BONETTO, A.A.; AHLGREN, M.O. Microorganisms and detritus in the diet of a typical neotropical riverine detritivore, *Prochilodus platensis* (Pisces, Prochilodontidae). **Limnology and Oceanography**, v.29, n.5, p.1120-1122. 1984.

BRIGGS, J.C. The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. **Journal of Biogeography**, v.32, n.2, p.287-294. 2005.

BROOKS, D.R.; MCLENNAN, D.A. **Phylogeny, ecology and behavior: a research program in comparative biology**. Chicago and London: The University of Chicago Press. 1991. 434 p.

BUCKUP, P. Phylogenetic interrelationships and reductive evolution in neotropical characidiin fishes (Characiformes, Ostariophysi). **Cladistics**, v.9, p.305-341. 1993.

BURRIDGE, C.P.; CRAW, D.; WATERS, J.M. An empirical test of freshwater vicariance via river capture. **Evolution**, v.60, p.1038–1049. 2007.

BUSH, M.B.; OLIVEIRA, P.E.D. The rise and fall of the Refugial Hypothesis of Amazonian Speciation: a paleoecological perspective. **Biota Neotropica**, v.6, n.1, p.<http://www.biotaneotropica.org.br/v6n1/pt/abstract?point-of-view+bn00106012006>. 2006.

CAPPARELLA, A.N.A.D.A.R.B. Neotropical avian diversity and riverine barriers. **Acta XX Congress International of Ornithology (Auckland 1990)**, v.1, p.307-316. 1991.

CARLING, M.D.; BRUMFIELD, R.T. Gene sampling strategies for multi-Locus population estimates of genetic diversity (h). **PLoS ONE**, v.2, n.1, p.e160. doi:10.1371/journal.pone.0000160. 2007.

CARVALHO-COSTA, L.F.; HATANAKA, T.; GALETTI-JR, P.M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1 (suppl), p.377-380. 2008.

CARVALHO-NETA, R.N.F.; CASTRO, A.C.L.D. Diversidade das assembléias de peixes estuarinos da Ilha dos Caranguejos, Maranhão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.41, n.1, p.48-57. 2008.

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Family Prochilodontidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. (Ed.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, p.65-70

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei:Ostariophysi:Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, v.622, p.1-189. 2004.

CAVALCANTI, M.J.; MONTEIRO, L.R.; LOPES, P.R.D. Landmark-based morphometric analysis in selected species of serranid fishes (Perciformes: Teleostei). **Zoological Studies**, v.38, p.287–294. 1999.

CHOV, S.; HAZAMA, K. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. **Molecular Ecology**, v.7, p.1247–1263. 1998.

CLARK, D.L. The Pliocene record in the central Arctic Ocean. **Marine Micropaleontology**, v.27, p.157–164. 1996.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v.9, p.1657–1659. 2000.

CONNOR, E.F. The role of Pleistocene forest refugia in the evolution and biogeography of tropical biotas. **TREE**, v.1, p.165–168. 1986.

CORONEL, J.S.; MAES, G.E.; CLAUS, S.; VAN DAMME, P.A.; VOLCKAERT, F.A.M. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. **Journal of Fish Biology**, v.65, n.3, p.859–. 2004.

COSTA, J.B.S.; BEMERGUY, R.L.; HASUI, Y.; BORGES, M.D.S.; JÚNIOR, C.R.P.F.; BEZERRA, P.É.L.; COSTA, M.L.D.; FERNANDES, J.M.G. NEOTECTÔNICA DA REGIÃO AMAZÔNICA: ASPECTOS TECTÔNICOS, GEOMORFOLÓGICOS E DEPOSICIONAIS. **Geonomos**, v.4, n.2, p.23–44. 1997.

COSTA, J.B.S.; BEMERGUY, R.L.; HASUI, Y.; BORGES, M.S. Tectonics and paleogeography along the Amazon river. **Journal of South American Earth Sciences**, v.14, p.335–347. 2001.

COSTA, J.B.S.; HASUI, Y.; BEMERGUY, R.L.; SOARES-JR, A.V.; VILLEGAS, J.M.C. Tectonics and paleogeography of the Marajó Basin, northern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.74, n.3, p.519–531. 2002.

COX, C.B.; MOORE, P.D. **Biogeography: an ecological and evolutionary approach**. 5 ed. . 1993. 326 p.

CRONIN, M.A.; SPEARMAN, W.J.; WILMOT, R.L.; PATTON, J.C.; W., B.J. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.50, p.708–715. 1993.

CROWLEY, T.J.; NORTH, G.R. **Monographs on Geology and Geophysics. Paleoclimatology**: Oxford Univ. Press, UK., v.16. 1991

DEINER, K.; GARZA, J.C.; COEY, R.; GIRMAN, D.J. Population structure and genetic diversity of trout (*Oncorhynchus mykiss*) above and below natural and man-made barriers in the Russian River, California. **Conservation Genetics**, v.8, p.437–454. 2007.

DERGAM, J.A.; PAIVA, S.R.; SCHAEFFER, C.E.; GODINHO, A.L.; VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.379-387. 2002.

DERGAM, J.A.; SUZUKI, H.I.; SHIBATTA, O.A.; DUBOC, L.F.; JR., H.F.J.; GIULIANO-CAETANO, L.; IV, W.C.B. Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae:Characiformes) in the Iguaçú, Tibagi, and Paraná Rivers. **Genet. Mol. Biol.**, v.21, n.4. 1998.

DIOGO, R. Phylogeny, origin and biogeography of catfishes: support for a Pangean origin of “modern teleosts” and reexamination of some Mesozoic Pangean connections between the Gondwanan and Laurasian supercontinents. **Animal Biology**, v.54, n.4, p.331-351. 2004.

DOWSETT, H.J.; CRONIN, T.M.; POORE, R.Z.; THOMPSON, R.S.; WHATLEY, R.C.; WOOD, A.M. Micropaleontological evidence for increased meridional heat transport in the North Atlantic Ocean during the Pliocene. **Science**, v.258, p.1133–1135. 1992.

EHLERS, J.; GIBBARD, P. Extent and chronology of Quaternary glaciation. **Episodes**, v.31, n.2. 2008.

ELLEGREN, H. Is genetic diversity really higher in large populations? **Journal of Biology**, v.8, p.41 (doi:10.1186/jbiol135). 2009.

EMSLEY, M.G. Speciation in *Heliconius* (Lep., Nymphalidae): Morphology and geographic distribution. **Zoologica**, v.50, n.191-254. 1965.

ENDLER, J. Pleistocene forest refuges: fact or fancy? In: PRANCE, G.T. (Ed.). **Biological Diversification in the Tropics**. New York: Columbia University Press, 1982, p.179-200

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50. 2005.

FAIRBRIDGE, R.W. Eustatic changes in sea level. In: AHRENS, L.H.; PRESS, F.; RANKAHA, K.; RUNCORN, S.K. (Ed.). **Physics and chemistry of the Earth**. London: Pergamon Press, 1961, p.99–185

FARIAS, I.P.; HRBEK, T. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.49, p.32-43. 2008.

FARIAS, I.P.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Molecular phylogeny of neotropical cichlids: the relationships of Cichlasomines and Heroines. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Ed.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998, p.499-508

FAUVELOT, C.; BERNARDI, G.; PLANES, S. Reductions in the mitochondrial dna diversity of coral reef fish provide evidence of population bottlenecks resulting from holocene sea-level change. **Evolution**, v.57, n.7, p.1571–1583. 2003.

FEITOSA, A.C.; TROVÃO, J.R. **Atlas escolar do Maranhão: espaço geo-histórico e cultural**. João Pessoa-PB: Editora Grafset. 2006. 207 p.

FELSENSTEIN, J. Accuracy of coalescent likelihood estimates: do we need more sites, more sequences, or more loci? **Molecular Biology and Evolution**, v.23, n.3, p.691–700. 2006.

FERRARIS JR, C.J.; VARI, R.P. The South American catfish genus *Auchenipterus* Valenciennes, 1840 (Ostariophysi: Siluriformes: Auchenipteridae): monophyly and relationships, with a revisionary study. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.126, p.387-450. 1999.

FERRARIS-JR, C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v.1418, p.1–628. 2007.

FERREIRA, C.S.; VICALVI, M.A.; MACEDO, A.C.M. Limites meridionais da Bacia de Pirabas, estado do Pará. **XXXIII Congresso Brasileiro de Geologia (Rio de Janeiro)**, v.1, p.326-329. 1984.

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

FLINT, R.F. **Glacial and Pleistocene geology**. New York: John Wiley & Sons. 1957

FORD, M.J. Applications of selective neutrality tests to molecular ecology. **Molecular Ecology**, v.11, p.1245–1262. 2002.

FOWLER, H.W. A collection of freshwater fishes obtained in Eastern Brazil by Dr. Rodolpho von Ihering. **Proc. Acad. Nat. Sci. Phila**, v.93, p.123-199. 1941.

FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. I. (3a. entrega). **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo**, v.6, p.1-625. 1951.

FREEMAN, S.; HERRRON, J.C. **Evolutionary analysis**: Pearson Prentice Hall. 2004. 820 p.

FROUFE, E.; KNIZHIN, I.; WEISS, S. Phylogenetic analysis of the genus *Thymallus* (grayling) based on mtDNA control region and ATPase 6 genes, with inferences on control region constraints and broad-scale Eurasian phylogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.34, n.1, p.106-117. 2005.

FU, Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v.147, p.915-925. 1997.

GARAVELLO, J.C.; ROCHA, O.; ESPÍNDOLA, E.G.; RIETZLER, A.C.; LEAL, A.C. Diversity of fauna in the interdunal lakes of “Lençóis Maranhenses”: II – The ichthyofauna. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.70, n.4, p.797 – 803. 1998.

GERY, J. The fresh-water fishes of South America. **Monogr. Biol.**, v.19, p.828-848. 1969.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil: Sub-ordem Characoidei; Bacia do Rio Mogi-Guaçu**: Editora Franciscana. 1975. 846 p.

GÓES, A.M.; FEIJÓ, F.J. Bacia do Parnaíba. **Boletim de Geociências da PETROBRAS**, v.8, n.1, p.57-67. 1994.

GOMES, F.E.M. Geologia estrutural e tectônica. In: RIBEIRO, J.A.P.; MELO, F.; VERÍSSIMO, L.S. (Ed.). **Programa Levantamentos Geológicos Básicos do Brasil. Caxias. Folha SB.23-X-B. Estado do Piauí e Maranhão – Escala 1:250.000**. Brasília: CPRM, 2001

GOULDING, M. Man and fisheries on an Amazon frontier. In: DUMONT, H.J. (Ed.). **Developments in Hydrobiology**: The Hague: W. Junk Publishers, 1981, p.137

HAFFER, J. On the 'river effect' in some forest birds of southern Amazonia. **Boletim do Museu Paraense E. Goeldi - Zoologia**, v.8, p.217-245. 1993a.

HAFFER, J. Time's cycle and Time's arrow in the history of Amazonia. **Biogeographica**, v.69, p.15-45. 1993b.

HAFFER, J. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. **Biodiversity and Conservation**, v.6, p.451-476. 1997.

HAQ, B.U.; HARDENBOL, J.; VAIL, P.R. Chronology of Fluctuating Sea Levels since the Triassic. **Science**, v.235, n.4793, p.1156-1167. 1987.

HATANAKA, T.; GALETTI-JR., P.M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.1, p.19-25. 2003.

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JR, P.M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v.126, p.153-159. 2006.

HEGGENES, J.; RØED, K.H. Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. **Ecology of Freshwater Fish**, v.15, p.366–375. 2006.

HEY, J.; MACHADO, C.A. The study of structured populations - new hope for a difficult and divided science. **Nature Reviews - Genetics**, v.4, p.535-543. 2003.

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

HOORN, C. Mangrove Forests and Marine Incursions in Neogene Amazonia (Lower Apaporis River, Colombia). **Palaios**, v.21, p.197–209. 2006a.

HOORN, C. The birth of the mighty Amazon. **Scientific American**, v.5, p.52-59. 2006b.

HOORN, C.; GUERRERO, J.; SARMIENTO, G.A.; LORENTE, M.A. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. **Geology**, v.23, p.237–240. 1995.

HOWARD, W.R. A warm future in the past. **Nature**, v.388, p.418–419. 1997.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; GARCIA-DAVILA, C.; PAUGY, D.; RENNO, J.-F. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v.16, p.2115–2136. 2007.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; RIVERA, R.; BONHOMME, F.; RENNO, J.-F. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. **Molecular Ecology**, v.16, p.2488–2503. 2007.

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

HUEY, J.A.; BAKER, A.M.; HUGHES, J.M. The effect of landscape processes upon gene flow and genetic diversity in an Australian freshwater fish, *Neosilurus hyrtlui*. **Freshwater Biology**, v.53, p.1393–1408. 2008.

IBGE. **Atlas do Maranhão**. Rio de Janeiro. 1984. 104 p.

IBGE. **Zoneamento Geoambiental do Estado do Maranhão - diretrizes gerais para a ordenação territorial**. Salvador. 1997

JOB, G. TREEFINDER version of October 2008. **Distributed by the author at www.treefinder.de**. 2008.

KAANDORP, R.J.G.; VONHOF, H.B.; WESSELINGH, F.P.; PITTMAN, L.R.; KROON, D.; VAN HINTE, J.E. Seasonal Amazonian rainfall variation in the Miocene Climate Optimum. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v.221, p.1–6. 2005.

KETMAIER, V.; BIANCO, P.G.; COBOLLI, M.; DE MATTHAEIS, E. Genetic differentiation and biogeography in southern European populations of the genus *Scardinius* (Pisces: Cyprinidae) based on allozyme data. **Zoologia Scripta**, v.32, n.1, p.13–22. 2003.

KLEIN, E.L.; MOURA, C.A.V.; KRYMSKY, R.S.; GRIFFIN, W.L. The Gurupi Belt, northern Brazil: Lithostratigraphy, geochronology, and geodynamic evolution. **Precambrian Research**, v. 141, p.83–105. 2005.

KLINGENBERG, C.P.; BARLUENGA, M.; MEYER, A. Body shape variation in cichlid fishes of the *Amphilophus citrinellus* species complex. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.80, p.397–408. 2003.

KOCHER, D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PÄÄBO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, v.86, p.6916–6200. 1989.

KORNFIELD, I.; PARKER, A. Molecular systematics of a rapidly evolving species flock: the mbuna of Lake Malawi and the search for phylogenetic signal. In: KOCHER, T.D.; STEPIEN, C.A. (Ed.). **Molecular systematics of fishes**: Academic Press, 1997, p.25-37

LANGERHANS, R.B.; LAYMAN, C.A.; LANGERHANS, A.K.; DEWITT, T.J. Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.80, p.689–698. 2003.

LASSALA, M.D.P.; RENESTO, E. Reproductive strategies and genetic variability in tropical freshwater fish. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.690-697. 2007.

LEDRU, M.-P.; CECCANTINI, G.; GOUVEIA, S.E.M.; LÓPEZ-SÁEZ, J.A.; PESSEDA, L.C.R.; RIBEIRO, A.S. Millennial-scale climatic and vegetation changes in a northern Cerrado (Northeast, Brazil) since the Last Glacial Maximum. **Quaternary Science Reviews**, v.25, p.1110–1126. 2006.

LEDRU, M.-P.; CORDEIRO, R.C.; DOMINGUEZ, J.M.L.; LOUIS MARTIN, P.M.; SIFEDDINE, A.; TURCQ, B. Late-Glacial Cooling in Amazonia Inferred from Pollen at Lagoa do Caçó, Northern Brazil. **Quaternary Research**, v.55, p.47–56. 2001.

LEE, W.-J.; CONROY, J.; HOWELL, W.H.; KOCHER, T.D. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. **Journal of Molecular Evolution**, v.41, p.54-66. 1995.

LEHNER, B.; VERDIN, K.; JARVIS, A. **HydroSHEDS Technical Documentation**. World Wildlife Fund US, Washington, DC. 2006. Disponível em <http://hydrosheds.cr.usgs.gov>.

LOVEJOY, N.R. Systematics of myliobatid 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, p.5–13. 2006.

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

LUCENA, C.A.S. Revisão taxonômica e relações filogenéticas das espécies de *Roeboides* grupo – *microlepis* (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Iheringia, série zoologia**, v.93, n.3, p.283-308. 2003.

LUCENA, C.A.S.D. Revisão taxonômica das espécies do gênero *Roeboides* grupo-*affinis* (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Iheringia, Sér. Zool.**, v.97, n.2, p.117-136. 2007.

LUCINDA, P.H.F.; ROSA, R.S.; REIS, R.E. Systematics and biogeography of the genus *Phallotorynus* Henn, 1916 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae, Poeciliinae), with description of three new species. **Copeia**, v.3, p.609-631. 2005.

LUNDBERG, J.G.; MARSHALL, L.G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M.C.S.L.; WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Ed.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDUPUCRS, 1998, p.13-48

MALABARBA, M.C.S.L. Revision of the Neotropical genus *Triportheus* Cope, 1872 (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v.2, n.4, p.167-204. 2004.

MARRINER, N.; MORHANGE, C.; MEULE, S. Holocene morphogenesis of Alexander the Great's isthmus at Tyre in Lebanon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.104, n.22, p.9218–9223. 2007.

MARTIN, A.P.; BERMINGHAM, E. Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical catfish. **Proceedings of the Royal Society of London B**, n.267, p.1135-1141. 2000.

MARTIN, L.; BERTAUX, J.; CORREGE, T.; LEDRU, M.P.; MOURGUIART, P.; SIFEDDINE, A.; SOUBIES, F.; WIRRMANN, D.; SUGUIO, K.; TURCQ, B. Astronomical forcing of contrasting rainfall changes in tropical South America between 12,400 and 8800 cal yr B.P. **Quaternary Research**, v.47, p.117–122. 1997.

MARTINS, C.; WASKO, A.P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.1, p.33-38. 2003.

MARTINS, E.D.S.F.; FILHO, P.W.M.E.S.; COSTA, F.R.D.; ALVES, P.J.D.O. Extração automatizada e caracterização da rede de drenagem e das bacias hidrográficas do nordeste do Pará ao noroeste do Maranhão a partir de imagens SRTM. **Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, INPE**, p.6827-6834. 2007.

MATTOX, G.M.T.; TOLEDO-PIZA, M.; OYAKAWA, O.T. Taxonomic study of *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1846) and *Hoplias macrophthalmus* (Pellegrin, 1907) (Ostariophysi, Characiformes, Erythrinidae). **Copeia**, v.3, p.516–528. 2006.

MCMILLAN, W.O.; PALUMBI, S.R. Concordant evolutionary patterns among Indo-West Pacific butterflyfishes. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.260, p.229-239. 1995.

MENEZES, N.A. Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das grandes bacias fluviais do Brasil. In: (Ed.). **Poluição e Piscicultura**: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai – CIBPU, 1970, p.73-78

MENEZES, N.A. Family Acestrorhynchidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. (Ed.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, p.231-233

MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA of fishes. In: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, P. (Ed.). **Molecular biology frontiers, biochemistry and molecular biology**. Amsterdam: Elsevier Press, 1993, p.1-38

- MMA. **Caderno da Região Hidrográfica Atlântico Nordeste Ocidental**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos. 2006. 128 p.
- MMA. **Caderno da Região Hidrográfica do Parnaíba**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos. 2006. 184 p.
- MMA. **Caderno da Região Hidrográfica do Tocantins-Araguaia**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos. 2006. 132 p.
- MMA. **Plano Nacional de Recursos Hídricos. Panorama e estado dos recursos hídricos do Brasil**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos, v.1. 2006. 280 p.
- MOLNAR, P.; CANE, M.A. El Niño's tropical climate and teleconnections as a blueprint for pre-Ice-Age climates. **Paleoceanography**, v.17, p.1-11. 2002.
- MONTEIRO, L.R.; REIS, S.F. **Princípios de morfometria geométrica**: Holos Editora. 1999. 198 p.
- MONTEIRO, M.F.; SILVA, T.C. **Aspectos fluviais importantes para a fotointerpretação**. Salvador: Universidade Federal da Bahia. 1979. 44 p.
- 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.
- MOYER, G.R.; WINEMILLER, K.O.; MCPHEE, M.V.; TURNER, T.F. Historical demography, selection, and coalescence of mitochondrial and nuclear genes in *Prochilodus* species of northern South America. **Evolution**, v.59, n.3, p.599-610. 2005.
- NEAR, T.J.; KASSER, T.W.; KOPPELMAN, J.B.; DILLMAN, C.B.; PHILIPP, D.P. Speciation in North American black basses, *Micropterus* (Actinopterygii: Centrarchidae). **Evolution**, v.57, n.7, p.1610-1621. 2003.
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**: Oxford University Press. 2000. 333 p.
- NOMURA, H. **Dicionário dos peixes do Brasil**. Brasília: Editerra. 1984. 482 p.
- NORES, M. An alternative hypothesis to the origin of Amazonian bird diversity. **Journal of Biogeography**, v.26, p.475-485. 1999.
- NORES, M. The implications of Tertiary and Quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. **Global Ecology and Biogeography**, v.13, p.149-161. 2004.
- O'REILLY, K.M.; HORN, M.H. Phenotypic variation among populations of *Atherinops affinis* (Atherinopsidae) with insights from a geometric morphometric analysis. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.1117-1135. 2004.

OSKIN, M.; STOCK, J. Marine incursion synchronous with plate-boundary localization in the Gulf of California. **Geology**, v.31, n.1, p.23-26. 2003.

OYAKAWA, O.T. **Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo *lacerdae*) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil. (Teleostei: Erythrinidae)**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

OYAKAWA, O.T. Family Erythrinidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS-JR., C.J. (Ed.). **Check List of Freshwater Fishes of South America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003, p.238-240

PAGE, R.D.M. Clocks, clades, cospeciation, comparing rates of evolution and timing of cospeciation events in host-parasite assemblages. **Systematic Zoology**, v.40, p.188-198. 1991.

PERES, M.D.; RENESTO, E.; LAPENTA, A.S.; ZAWADZKI, C.H. Genetic Variability in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes: Erythrinidae) in Fluvial and Lacustrine Environments in the Upper Paraná River Floodplain (Paraná State, Brazil). **Biochemical Genetics**, v.40, n.7/8, p.209-223. 2002.

PESSENDA, L.C.R.; RIBEIRO, A.D.S.; GOUVEIA, S.E.M.; RAMON ARAVENA, R.B.; BENDASSOLLI, J.A. Vegetation dynamics during the late Pleistocene in the Barreirinhas region, Maranhão State, northeastern Brazil, based on carbon isotopes in soil organic matter. **Quaternary Research**, v.62, p.183– 193. 2004.

PETRI, S.; FÚLFARO, V.J. **Geologia do Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 1983. 631 p.

PETRY, A.C.; AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. Fish assemblages of tropical floodplain lagoons: exploring the role of connectivity in a dry year. **Neotropical Ichthyology**, v.1, n.2, p.111-119. 2003.

PFRENDER, M.E.; HICKS, J.; LYNCH, M. Biogeographic patterns and current distribution of molecular-genetic variation among populations of speckled dace, *Rhinichthys osculus* (Girard). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.30, n.3, p.490-502. 2004.

PIORSKI, N.M. **Estudo taxonômico do gênero *Platydoras* Bleeker, 1863 (Siluriformes, Doradidae)**. Rio Claro-SP: Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). 1997. 79 p.

PIORSKI, N.M.; ALVES, J.R.L.; MACHADO, M.R.B.; CORREIA, M.M.F. Alimentação e ecomorfologia de duas espécies de piranhas (Characiformes: Characidae) do lago de Viana, estado do Maranhão, Brasil. **Acta Amazonica**, v.35, n.1, p.63 - 70. 2005.

PIORSKI, N.M.; CASTRO, A.C.L.; PEREIRA, L.G.; MUNIZ, M.E.L. Ictiofauna do trecho inferior do rio Itapecuru, Nordeste do Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v.11, p.15-24. 1998.

PIORSKI, N.M.; CASTRO, A.C.L.; PINHEIRO, C.U.B. A prática da pesca entre grupos indígenas das bacias dos rios Pindaré e Turiaçu, no Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v.16, p.67-74. 2003.

PIORSKI, N.M.; CASTRO, A.C.L.; SOUSA-NETO, A.M. Ichthyofauna from the Cerrado of the southern Maranhão. In: BARRETO, L. (Ed.). **North Cerrado of Brazil**. Pelotas, RS: USEB, 2007, p.197-212

PIORSKI, N.M.; GARAVELLO, J.C.; ARCE-H., M.; PÉREZ, M.H.S. *Platydoras brachylecis*, a new species of thorny catfish (Siluriformes: Doradidae) from northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n.3, p.481-494. 2008.

POMPEU, P.S.; GODINHO, H.P. Effects of extended absence of flooding on the fish assemblages of three floodplain lagoons in the middle São Francisco River, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.4, n.4, p.427-433. 2006.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v.25, p.1253-1256. 2008.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. **Molecular Ecology**, v.9, p.487-488. 2000.

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

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO-JR., H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.D.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.421-430. 2002.

RAND, D.M. Neutrality tests of molecular markers and the connections between DNA polymorphism, demography, and conservation biology. **Conservation Biology**, v.10, p.665-671. 1996.

RANNALA, B.; YANG, Z. Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. **Genetics**, v.164, p.1645-1656. 2003.

RANNALA, B.; YANG, Z. Inferring Speciation Times under an Episodic Molecular Clock. **Systematic Biology**, v.56, n.3, p.453-466. 2007.

REID, S.M.; WILSON, C.C.; MANDRAK, N.E.; CARL, L.M. Population structure and genetic diversity of black redhorse (*Moxostoma duquesnei*) in a highly fragmented watershed. **Conservation Genetics**, v.9, p.531-546. 2008.

REIS, R.E. Systematic revision of the Neotropical characid subfamily Stethaprioninae (Pisces, Characiformes). **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Série Zoologia**, v.6, n.6, p.3-86. 1989.

- REIS, R.E. Systematics, biogeography, and the fossil record of the Callichthyidae: a review of the available data. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Ed.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998, p.351-362
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Check List of Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 2003. 742 p.
- REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Upper Paraná River. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, n.3, p.381-388. 1997.
- RIBEIRO, A.C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v.4, n.2, p.225-246. 2006.
- ROBINSON-RECHAVI, M.; HUCHON, D. RRTree: Relative-Rate Tests between groups of sequences on a phylogenetic tree. **Bioinformatics**, v.16, n.3, p.296-297. 2000.
- ROHLF, F.J. tpsRelw, relative warps analysis, version 1.45. **Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook**. 2007a.
- ROHLF, F.J. tpsRegr, shape regression, version 1.34. **Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook**. 2007b.
- ROHLF, F.J. tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.12. **Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook**. 2008.
- ROHLF, F.J.; LOY, A.; CORTI, M. Morphometric analysis of old world Talpidae (Mammalia, Insectivora) using partial warps scores. **Systematic Biology**, v.45, n.3, p.344-362. 1996.
- ROHLF, F.J.; SLICE, D. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. **Systematic Zoology**, v.39, p.40-59. 1990.
- ROSA, R.; CAETANO-FILHO, M.; SHIBATTA, O.A.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytotaxonomy in distinct populations of *Hoplias* aff. *malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) from lower Paranapanema River basin. **Journal of Fish Biology**, v.75, p.2682-2694. 2009.
- ROSSETTI, D.F. Influence of low amplitude/high frequency relative sea-level changes in a wave-dominated estuary (Miocene), São Luis Basin, northern Brazil. **Sedimentary Geology**, v.133, p.295-324. 2000.
- ROSSETTI, D.F. Late Cenozoic sedimentary evolution in northeastern Pará, Brazil, within the context of sea level changes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 14, p.77-89. 2001.
- ROSSETTI, D.F.; TOLEDO, P.M.; GÓES, A.M. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. **Quaternary Research**, v.63, p.78-89. 2005.

- ROSSETTI, D.F.; VALERIANO, M.M. Applying SRTM topographic data to characterize a Quaternary paleovalley in northern Brazil. **Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, INPE, Florianópolis, Brasil**, p.2125-2132. 2007.
- ROY, D.; DOCKER, M.F.; HEHANUSSA, P.; HEATH, D.D.; HAFFNER, G.D. Genetic and morphological data supporting the hypothesis of adaptive radiation in the endemic fish of Lake Matano. **Journal of Evolutionary Biology**, v.17, p.1268–1276. 2004.
- SABAJ, M.H.; FERRARIS JR, C.J. Family Doradidae (Thorny catfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; JR., C.J.F. (Ed.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, p.456-469
- SANJUR, O.I.; CARMONA, J.A.; DOADRIO, I. Evolutionary and biogeographical patterns within Iberian populations of the genus *Squalius* inferred from molecular data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.29, n.1, p.20-30. 2003.
- SANTOS, G.M.; MÉRONA, B.; JURAS, A.A.; JÉGU, M. **Peixes do baixo rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica de Tucuruí**. Brasília: Eletronorte. 2004. 215 p.
- SANTOS, M.C.F.; RUFFINO, M.L.; FARIAS, I.P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v.71 (Supplement A), p.33–44. 2007.
- SANTOS, U.; VÖLCKER, C.M.; BELEI, F.A.; CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C.; PAIVA, S.R.; DERGAM, J.A. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, v.75, p.2326–2343. 2009.
- SCHOBENHAUS, C.; NEVES, B.B.D.B. A Geologia do Brasil no Contexto da Plataforma Sul-Americana. In: BIZZI, L.A.; SCHOBENHAUS, C.; VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, J.H. (Ed.). **Geologia, Tectônica e Recursos Minerais do Brasil**. Brasília: CPRM, 2003
- SHACKLETON, N.J.; OPDYKE, N.D. Oxygen isotope and palaeomagnetic evidence for early Northern Hemisphere glaciation. **Nature**, v.270, p.216–219. 1997.
- SICK, H. Rios e enchentes na Amazônia como obstáculo para a avifauna. **Atas Simpósio sobre a Biota Amazônica**, v.5, p.495-520. 1967.
- SIDLAUSKAS, B.; CHERNOFF, B.; MACHADO-ALLISON, A. Geographic and environmental variation in *Bryconops* sp. cf. *melanurus* (Ostariophysi: Characidae) from the Brazilian Pantanal. **Ichthyological Research**, v.53, p.24–33. 2006.
- SILVA, A.J.P.D.; LOPES, R.D.C.; VASCONCELOS, A.M.; BAHIA, R.B.C. Bacias Sedimentares Paleozóicas e Meso-Cenozóicas Interiores. In: BIZZI, L.A.; SCHOBENHAUS, C.; VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, J.H. (Ed.). **Geologia, Tectônica e Recursos Minerais do Brasil**. Brasília: CPRM, 2003
- SILVA, S.R.P.; MACIEL, R.R.; SEVERINO, M.C.G. Cenozoic tectonics of Amazon Mouth Basin. **Geo-Marine Letters**, v.18, p.256-262. 1999.

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.

SO, N.; HOUDT, J.K.J.V.; VOLCKAERT, F.A.M. Genetic diversity and population history of the migratory catfishes *Pangasianodon hypophthalmus* and *Pangasius bocourti* in the Cambodian Mekong River. **Fisheries Science**, v.72, p.469–476. 2006.

SOARES, E.C. **Peixes do Mearim**. São Luís: Instituto GEIA. 2005. 143 p.

SOUSA, R.G.C.; FREITAS, C.E.C. The influence of flood pulse on fish communities of floodplain canals in the Middle Solimões River, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.6, n.2, p.249-255. 2008.

SRH/MMA. **Ecorregiões aquáticas do Brasil**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente / Secretaria de Recursos Hídricos. 2005

STAECK, W.; SCHINDLER, I. *Geophagus parnaíbae* sp. n. – a new species of cichlid fish (Teleostei: Perciformes: Cichlidae) from the rio Parnaíba basin, Brazil. **Zoologische Abhandlungen (Dresden)**, v.55, p.69-75. 2006.

SUZUKI, H.I.; AGOSTINHO, A.A. Reprodução de peixes do reservatório de Segredo. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. (Ed.). **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997, p.163-182

SUZUKI, H.I.; BULLA, C.K.; AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. Estratégias reprodutivas de assembléias de peixes em reservatórios. In: RODRIGUES, L.; THOMAZ, S.M.; AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. (Ed.). **Biocenoses em reservatórios: padrões espaciais e temporais**. São Carlos-SP: RIMA, 2005, p.223-242

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, p.585–595. 1989.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599. 2007.

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

TEMPLETON, A.R. **Population genetics and microevolutionary theory**: John Wiley & Sons, Inc. 2006

THOMAS, M.F.; THORP, M.B. Geomorphic response to rapid climatic and hydrologic change during the late pleistocene and early holocene in the humid and sub-humid tropics. **Quaternary Science Reviews**, v.14, p.193-207. 1995.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4882. 1997.

TOFTS, R.; SILVERTOWN, J. A phylogenetic approach to community assembly from a local species pool. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.267, p.363-369. 2000.

TRIQUES, M.L. Three new species of *Rhamphichthys* Müller et Troschell, 1846 (Ostariophysi: Gymnotiformes: Rhamphichthyidae). **Revue Française d'Aquariologie**, v.26, n.1-2, p.1-6. 1999.

TURNER, T.F.; MCPHEE, M.V.; CAMPBELL, P.; WINEMILLER, K.O. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.86–201. 2004.

VAN DER HAMMEN, T.; HOOGHMSTRA, H. Neogene and Quaternary history of vegetation, climate and plant diversity in Amazonia. **Quaternary Science Reviews**, v.19, p.725– 742. 2000.

VARI, R.P. The Curimatidae, lowland neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism and phylogenetic biogeography. In: VANZOLINI, P.E.; HEYER, W.R. (Ed.). **Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988, p.343-377

VARI, R.P. Systematics of the neotropical characiform genus *Curimata* Bosc (Pisces: Characiformes). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v.444, p.1-63. 1989a.

VARI, R.P. Systematics of the Neotropical characiform genus *Psectrogaster* Eigenmann and Eigenmann (Pisces, Characiformes). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v.481, p.1-43. 1989b.

VEDEL, V.; BEHLING, H.; COHEN, M.; LARA, R. Holocene mangrove dynamics and sea-level changes in northern Brazil, inferences from the Taperebal core in northeastern Pará State. **Veget Hist Archaeobot**, v.15, p.115–123. 2006.

VEIGA JR, J.P.; OLIVEIRA, R.G.D. Arcabouço tectônico. In: VEIGA JR, J.P. (Ed.). **Programa Levantamentos Geológicos Básicos do Brasil. São Luís NE/SE, Folhas SA.23-X e SA.23-Z. Estados do Maranhão e Piauí. Escala 1:500.000**. Recife: CPRM, 2000

VERGARA, J.; AZPELIQUETA, M.D.L.M.; GARCIA, G. Phylogeography of the Neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la Plata basin, South America, and conservation remarks. **Neotropical Ichthyology**, v.6, n.1, p.75-85. 2008.

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.103-110. 2005.

VICARI, M.R.; PAZZA, R.; ARTONI, R.F.; MARGARIDO, V.P.; BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetics and Biogeography: Considerations about the Natural Origin of *Hoplias*

malabaricus (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguazu River. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.2, p.297-303. 2006.

VILLWOCK, J.A.; TOMAZELLI, J.L.; LOSS, E.L.; DEHNARDT, E.A.; HORN FILHO, N.; BACHI, F.A.; DEHNHARDT, B.A. Geology of the Rio Grande do Sul coastal province. In: BALKEMA, A.A. (Ed.). **Quaternary of South America and Antarctic Peninsula. Vol. 4**, 1986, p.79-97

VITAL, H.; STATTEGGER, K. Lowermost Amazon River: evidence of late Quaternary sea-level fluctuations in a complex hydrodynamic system. **Quaternary International**, v.72, p.53-60. 2000.

WASKO, A.P.; GALETTI-JR, P.M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiologia**, v.474, p.131-137. 2002.

WEBB, S.D.; RANCY, A. Late Cenozoic evolution of Neotropical mammal fauna. In: JACKSON, J.B.C.; BUDD, A.F.; COATES, A.G. (Ed.). **Evolution and Environment in Tropical America**. Chicago, USA: University of Chicago Press 1996, p.335– 358

WEITZMAN, S.H.; MENEZES, N.A.; WEITZMAN, M.J. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: VANZOLINI, P.E.; HEYER, W.R. (Ed.). **Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988, p.379-427

WEITZMAN, S.H.; WEITZMAN, M. Biogeography and evolutionary diversification in neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. In: PRANCE, G.T. (Ed.). **Biological diversification in the tropics**. New York: Columbia University Press, 1982, p.403-422

WESSELINGH, F.P.; MACSOTAY, O. *Pachydon hettneri* (Anderson, 1928) as indicator for Caribbean–Amazonian lowland connections during the Early–Middle Miocene. **Journal of South American Earth Sciences**, v.21, p.49–53. 2006.

WHITEHOUSE, P.L.; ALLEN, M.B.; MILNE, G.A. Glacial isostatic adjustment as a control on coastal processes: An example from the Siberian Arctic. **Geology**, v.35, n.8, p.747-750. 2007.

WILEY, E.O. Vicariance biogeography. **Annual Reviews of Ecology and Systematic**, v.19, p.513-542. 1988.

WILSON, A.B.; TEUGELS, G.G.; MEYER, A. Marine Incursion: The freshwater herring of Lake Tanganyika are the product of a marine invasion into west Africa. **PLoS ONE 3(4): e1979. doi:10.1371/journal.pone.0001979**, v.3, n.4, p.1-12. 2008.

WILSON, A.C.; CANN, R.L.; CARR, S.M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U.B.; HELM-BYCHOWSKI, K.M.; HIGUCHI, R.G.; PALUMBI, S.R.; PRAGER, E.M.; SAGE, R.D.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.26, p.375-400. 1985.

WIMBERGER, P.H.; REIS, R.E.; THORNTON, K. Mitochondrial phylogenetics, biogeography, and evolution of parental care and mating systems in *Gymnogeophagus* (Perciformes: Cichlidae). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (Ed.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998, p.509-518

WONG, B.B.M.; KEOGH, J.S.; MCGLASHAN, D.J. Current and historical patterns of drainage connectivity in eastern Australia inferred from population genetic structuring in a widespread freshwater fish *Pseudomugil signifier* (Pseudomugilidae). **Molecular Ecology**, v.13, n.2, p.391-401. 2004.

WOODROFFE, C.D. Response of tide-dominated mangrove shorelines in northern Australia to anticipated sea-level rise. **Earth Surface Processes and Landforms**, v.20, n.1, p.65-85. 1995.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, p.323-354. 1951.

XIA, X. **Data analysis in molecular biology and evolution**: Kluwer Academic Publishers. 2002. 280 p.

YANG, Z. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1586-1591. 2007.

ZÁRATE, M.A.; FASANA, J.L. The Plio-Pleistocene record of the central eastern Pampas, Buenos Aires Province, Argentina: the Chapadmalal case study. **Paleogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v.72, p.27-52. 1989.