

UDSON SANTOS

**FILOGEOGRAFIA DE TRAÍRAS *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)
(Teleostei, Erythrinidae) DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DA AMÉRICA DO
SUL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237f
2013

Santos, Udson 1986-

Filogeografia de traíras *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)
(Teleostei, Erythrinidae) das bacias hidrográficas da América
do Sul / Udson Santos. – Viçosa, MG, 2013.
x, 123 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Peixe - América do Sul. 2. Biogeografia.
3. Geomorfologia. 4. Zoogeografia. 5. Peixe - Distribuição
geográfica. 6. Evolução (Biologia). 7. Peixe - Filogenia.
8. Citogenética. 9. Ácido desoxirribonucléico. 10. Ictiologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Animal. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento. II. Título.

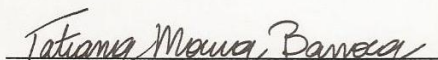
CDD 22. ed. 597.48

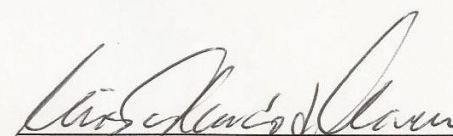
UDSON SANTOS

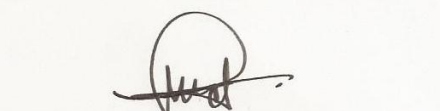
**FILOGEOGRAFIA DE TRAÍRAS *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)
(Teleostei, Erythrinidae) DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DA AMÉRICA DO
SUL**

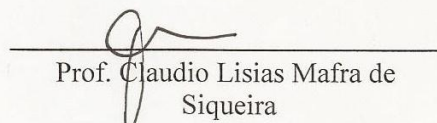
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

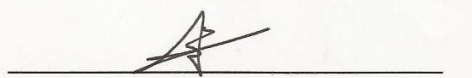
Aprovada: 16 de julho de 2013.


Prof.ª Tatiana Moura Barroca


Prof. Luiz Orlando de Oliveira


Prof. Lucio Antonio de Oliveira
Campos


Prof. Claudio Lisias Mafra de
Siqueira


Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos
(orientador)

There are no facts, only interpretations (Friedrich Nietzsche 1844-1900).

AGRADECIMENTOS

À minha família: João Batista Santos, Romilda Maria Ferreira Santos e Willian Leandro dos Santos (brother), agradeço os exemplos de honestidade, compromisso com seus objetivos e confiança, elementos indispensáveis para uma sólida formação humana e profissional.

À minha querida Priscilla Caroline Silva, agradeço o companheirismo, amor, apoio e cumplicidade.

Ao meu amigo Jorge Abdala Dergam, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela confiança, orientações e apoio.

Aos companheiros de laboratório, obrigado pela troca de experiências e amizade ao longo dos anos.

Aos colegas que realizaram a coleta das amostras depositadas no banco de tecidos do Laboratório de Sistemática Molecular da Universidade Federal de Viçosa, muito obrigado por o terem feito. Em especial à Nicole Ibagón, pela coleta das importantíssimas amostras da bacia hidrográfica do rio Magdalena.

Aos amigos de república: Leonardo Araújo, Márcio Gomes, Eduardo Guatimosim, Alexandre Drumond, Marcos Clemente, Lucas Silva, Flávio Bastos, Danilo Paulucio e Dalton Junior, muito obrigado pela troca de experiências e ótima convivência.

Ao CNPq e ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, obrigado pelo auxílio financeiro.

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a execução deste trabalho.

Obrigado!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 <i>A FILOGEOGRAFIA É UMA CIÊNCIA MULTIDICPLINAR</i>	1
1.2 <i>HOPLIAS MALABARICUS É UM COMPLEXO DE ESPÉCIES COM CARACTERÍSTICAS IDEAIS PARA ESTUDOS FILOGEOGRÁFICOS</i>	4
1.3 <i>A UTILIZAÇÃO DO GENE MITOCONDRIAL ATPASE6 E NUCLEAR RAG2 E DE INFORMAÇÕES CITOGENÉTICAS PARA ESTABELECEER AS RELAÇÕES GENEALÓGICAS ENTRE AS POPULAÇÕES DE HOPLIAS MALABARICUS.....</i>	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 <i>GERAL.....</i>	9
2.2 <i>ESPECÍFICOS.....</i>	9
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
I. CAPÍTULO 1: FILOGEOGRAFIA DE HOPLIAS MALABARICUS (BLOCH, 1794) (TELEOSTEI, ERYTHRINIDAE) DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS AMAZONAS E PARAGUAI	16
1. RESUMO.....	17
2. INTRODUÇÃO	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4. RESULTADOS.....	28
5. DISCUSSÃO	39
6. REFERÊNCIAS.....	49
II. CAPÍTULO 2: BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA DOS CARIOMORFOS DE HOPLIAS MALABARICUS (BLOCH, 1794) (TELEOSTEI, ERYTHRINIDAE) NAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DA AMÉRICA DO SUL	61
1. RESUMO.....	62
2. INTRODUÇÃO	64
3. MATERIAIS E MÉTODOS	70
4. RESULTADOS.....	77
5. DISCUSSÃO	89
6. REFERÊNCIAS.....	109
CONCLUSÕES GERAIS.....	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA I.1 RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DOS HAPLÓTIPOS <i>ATPASE6</i> DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i>	29
FIGURA I.2 DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLOGRUPOS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> NAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS CARONI (ILHA DE TRINIDAD), MAGDALENA, ORINOCO, AMAZONAS, TOCANTINS, PARAGUAI E URUGUAI.	30
FIGURA I.3 REDES DE HAPLÓTIPOS COM O GENE <i>ATPASE6</i> REPRESENTANDO AS DISPERSÕES DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> ENTRE AS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS AMAZONAS E PARAGUAI.....	31
FIGURA I.4 DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS <i>ATPASE6</i> DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> NO ESCUDO CRISTALINO BRASILEIRO E NAS TERRAS BAIXAS DA AMAZÔNIA.....	34
FIGURA I.5 REDE DE HAPLÓTIPOS COM O GENE <i>RAG2</i> EM POPULAÇÕES DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i>	36
FIGURA I.6 HIPÓTESES DE TEMPO DE DIVERGÊNCIA MOLECULAR ENTRE OS HAPLOGRUPOS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i>	38
FIGURA II.1 DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLOGRUPOS INDICADOS A PARTIR DO PADRÃO DE VARIAÇÃO DO GENE <i>ATPASE6</i> DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i>	78
FIGURA II.2 ESTIMATIVAS DE TEMPO DE DIVERGÊNCIA MOLECULAR ENTRE OS HAPLOGRUPOS E CARIOMORFOS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> E ROTAS DE DISPERSÃO A PARTIR DO NORTE/NOROESTE DA AMÉRICA DO SUL.....	80
FIGURA II.3 REDE DE HAPLÓTIPOS DO GENE <i>ATPASE6</i> COM AS AMOSTRAS PRESENTES NO HAPLOGRUPO III.	83
FIGURA II.4 REDE DE HAPLÓTIPOS DO GENE <i>ATPASE6</i> COM AS AMOSTRAS PRESENTES NO HAPLOGRUPO IV.....	84
FIGURA II.5 REDE DE HAPLÓTIPOS DO GENE <i>ATPASE6</i> COM AS AMOSTRAS PRESENTES NO HAPLOGRUPO V.	85
FIGURA II.6 CORRELAÇÃO ENTRE O GENE NUCLEAR, HAPLÓTIPO MITOCONDRIAL E NÚMERO DIPLOIDE EM <i>HOPLIAS MALABARICUS</i>	88

LISTA DE TABELAS

TABELA I.1 AMOSTRAS DE TECIDOS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> DEPOSITADAS NO LABORATÓRIO DE SISTEMÁTICA MOLECULAR BEAGLE (UFV) UTILIZADAS, COORDENADAS GEOGRÁFICAS E LOCAIS DE COLETA	24
TABELA I.2 DISTÂNCIA MOLECULAR MÉDIA ENTRE HAPLÓTIPOS <i>ATPASE6</i> DO HAPLOGRUPO AMAZONAS/ORINOCO COLETADOS NA BACIA HIDROGRÁFICA AMAZÔNICA E DO RIO TOCANTINS	35
TABELA II.1 AMOSTRAS DE TECIDOS DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> DEPOSITADAS NO LABORATÓRIO DE SISTEMÁTICA MOLECULAR BEAGLE (UFV) UTILIZADAS, COORDENADAS GEOGRÁFICAS E LOCAIS DE COLETA	71
TABELA II.2 DISTÂNCIA MOLECULAR ENTRE E DENTRO DOS HAPLOGRUPOS GERADOS PELAS ANÁLISES DE BAYESIANA E MÁXIMA PARCIMÔNIA COM O GENE <i>ATPASE6</i> EM POPULAÇÕES DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i>	79

RESUMO

SANTOS, Udson, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Filogeografia de traíras *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) das bacias hidrográficas da América do Sul.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Coorientadores: Karla Suemy Clemente Yotoko e Rubens Pazza.

A América do Sul é o continente com o maior número de espécies de peixes de água doce no mundo. Para compreender os processos responsáveis por esta espetacular diversificação é preciso uma análise que inclua os processos paleoclimáticos, geomorfológicos e paleohidrológicos na cladogênese de táxons de ampla distribuição. Este trabalho caracterizou os padrões filogeográficos de *Hoplias malabaricus* das bacias hidrográficas da América do Sul, utilizando sequências de DNA (mitocondrial e nuclear) e dados citogenéticos, incluindo os resultados no contexto paleohidrológico e de distribuição de fauna nessa região. Duzentos e oitenta e três espécimes foram analisados. As análises de inferência bayesiana e máxima parcimônia foram realizadas utilizando o gene mitocondrial ATP sintase 6 (*ATPase6*). As redes de haplótipos com os genes *ATPase6* e nuclear ativador de recombinação 2 (*RAG2*) foram construídas utilizando o software Network 4.6.1.1. A estimativa de tempo de divergência entre os haplogrupos foi realizada utilizando as sequências do gene *ATPase6* no software BEAST 1.5.1. O norte/noroeste da América do Sul foi identificado como o centro de origem de *Hoplias malabaricus* e a partir do Mioceno este táxon aumentou a distribuição para o sul do continente. Nesta época, a redução do número diploide de 42 para 40 cromossomos já estava estabelecida. A partir do Plioceno, a formação do cânion e salto de Sete Quedas levou ao isolamento das populações com o cariomorfo $2n=40C$ do baixo rio Paraná daquelas da porção alta da bacia, onde se estabeleceu o cariomorfo $2n=39/40D$. Na bacia hidrográfica amazônica, o padrão de variação do gene *ATPase6* indicou dois cenários possíveis: durante o Plioceno inferior ocorreu uma segunda redução no número diploide de $2n=42$ para $2n=40$ cromossomos em *H. malabaricus*, ou ocorreu fluxo gênico entre espécimes que possuem o número diploide diferente. A partir do Plioceno, espécimes com o cariomorfo $2n=40F$ estabeleceram-se nos rios São Francisco e Parnaíba e nas bacias costeiras do nordeste do Brasil. Durante o Pleistoceno, a formação de paleo-canais com água doce, na linha da costa oriental do

continente, permitiu o fluxo gênico entre populações de *H. malabaricus* que hoje estão isoladas nas bacias costeiras. A evolução e diversificação das populações de *Hoplias malabaricus*, e possivelmente de outras espécies de peixes dulcícolas da América do Sul, são decorrentes de três principais fatores. O primeiro são implicações do soerguimento dos Andes, as quais determinaram importantes mudanças paleohidrológicas e conseqüentemente no padrão de distribuição das populações deste táxon em todo o continente. O segundo envolve dinâmicas locais de capturas de cabeceiras decorrentes de reativação de falhas geológicas ou processos erosivos diferenciais, os quais levam a algumas drenagens a apresentarem um mosaico de linhagens genealógicas que diferenciaram nas bacias vizinhas (ex. alto Paraná). O terceiro fator envolve as dinâmicas glaciais, que levaram à confluência e posterior separação de grupos de drenagens costeiras em setores geomorfológicos bem definidos e conseqüentemente a uma pequena distância genética entre populações hoje isoladas.

ABSTRACT

SANTOS, Udson, D. Sc., Universidade Federal de Vicosa, July, 2013. **Phylogeography of trahiras *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) from South American watersheds.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-advisers: Karla Suemy Clemente Yotoko and Rubens Pazza.

South America is the continent with the largest number of freshwater fish species. To understand which facts were responsible for this diversification, analyses considering paleoclimatic, geomorphologic and paleohidrologic effects in the cladogenesis of widely distributed taxa are necessary. Phylogeographic patterns of *Hoplias malabaricus* populations from South America basins were characterized in this study with DNA sequences (mitochondrial and nuclear) and cytogenetic data, including results in paleohidrologic scenario and comparing not related fish fauna distribution. Two hundred and eighty-three specimens were analyzed. Bayesian and maximum parsimony analyses were performed with mitochondrial ATP synthase 6 gene (*ATPase6*). Haplotypes networks with *ATPase6* and recombination activating nuclear 2 (*RAG2*) genes were constructed with Network 4.6.1.1. Software. Time divergence between haplogroups was estimated using *ATPase6* gene sequences on BEAST 1.5.1. Software. North/northwest of South America was identified as *H. malabaricus* origin center and on Miocene this taxon expanded its distribution to the southern part of the continent. The diploid number reduction from 42 to 40 chromosomes was already established at this time. During Pliocene, canyon and Sete Quedas waterfalls were forming and populations with $2n = 40C$ from the lower Paraná River were separated from those from the upper part of the basin, where $2n = 39/40D$ karyomorph was established. The *ATPase6* gene variation in Amazon Basin, indicated two possible scenarios: during the lower Pliocene, there was a second diploid number reduction in *H. malabaricus*, or there was gene flowing between specimens with $2n=40$ and $2n=42$ chromosomes. After lower Pliocene, $2n = 40F$ karyomorph settled in São Francisco, Parnaíba and northeast Brazilian coastal river basins. During Pleistocene, paleo-channels with freshwater on Brazilian Coast allowed gene flowing among *H. malabaricus* populations, today isolated in this region. The evolution and diversification of *H. malabaricus* populations, and probably other freshwater fish species from South America, are due to three main factors. The first is the implications of the Andes upflit, which brought important

paleohidrologic changes and consequently changes on South America *H. malabaricus* distribution. The second factor involves local dynamics of stream piracy due to geological faults reactivation or differential erosion processes, which lead some drainages to present a mosaic of genealogical lineages that differed in neighboring basins (eg. upper Paraná). The third factor involves the glacial dynamics, leading to confluence and subsequent separation of river basins on coastal geomorphological sections and consequently a small genetic distance among populations today isolated.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *A filogeografia é uma ciência multidisciplinar*

O termo filogeografia refere-se ao estudo dos processos históricos que determinaram a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (Avice *et al.*, 1987). É uma área recente das ciências biológicas, criada a partir dos trabalhos iniciais realizados por Avice e colaboradores na década de 1980. Estudos filogeográficos procuram compreender quais os processos micro e macroevolutivos que resultaram nos padrões biogeográficos observados. Para alcançar este objetivo, o filogeógrafo faz uma articulação integrativa entre diversas disciplinas, tais como: sistemática filogenética, genética de populações, etologia, demografia, paleontologia, geologia, paleoclimatologia, geomorfologia e dinâmica de paisagem. Embora na sua primeira versão a ferramenta proposta fosse o DNA mitocondrial, o conceito ampliou-se e hoje qualquer grupo de caracteres que recuperem linhagens genealógicas (informações citogenéticas, moleculares, morfológicas e comportamentais) de táxons ou populações distribuídas em um espaço geográfico conhecido permite a elaboração de hipóteses filogeográficas (Avice, 1994; Avice, 2009).

A realização de estudos filogeográficos entre populações da mesma espécie são mais frequentes, devido à maior facilidade de explicar os padrões de distribuição das genealogias na dimensão geográfica. Os processos de dispersão e vicariância de populações intraespecíficas são mais recentes e de caráter microevolutivo, se comparados aos eventos cladogenéticos responsáveis pela divergência entre táxons

superiores. Evidências paleoclimáticas, geomorfológicas, paleohidrológicas e climatológicas representam registros cuja abundância é inversamente proporcional ao período decorrente dos eventos até o presente. Logo, a falta de conhecimento dos eventos responsáveis pela cladogênese de táxons superiores dificulta a elaboração de hipóteses filogeográficas interespecíficas.

A maior facilidade em reconhecer os padrões filogeográficos intraespecíficos também é auxiliada pelo livre fluxo gênico entre indivíduos da mesma espécie, quando em simpatria, criando a premissa que os eventos responsáveis pelas ramificações nas genealogias são determinados por fatores exógenos (ex. barreiras físicas) que impediram o fluxo gênico. Já os eventos cladogenéticos responsáveis pela especiação podem ser endógenos ou exógenos, em uma mesma área de distribuição (especiação simpátrica e parapátrica), nem sempre sendo possível reconhecer um componente geográfico na análise. Abaixo seguem as premissas que embasaram a formulação das primeiras hipóteses filogeográficas intraespecíficas: (1) a maior parte das espécies é composta por populações com um padrão de distribuição geográfica congruente com suas genealogias intraespecíficas; (2) espécies com alta taxa de dispersão em áreas sem barreiras geográficas ao fluxo gênico não são bons modelos para estudos filogeográficos, pois é observada pouca ou nenhuma congruência entre as linhagens genealógicas e a distribuição das populações no espaço e (3) linhagens monofiléticas separadas por grandes distâncias genéticas surgem de persistentes barreiras geográficas ao fluxo gênico (Avice *et al.*, 1987). Estas premissas foram geralmente validadas por trabalhos com diversos grupos de organismos durante as últimas décadas. Espécies de baixa vagilidade, com ampla distribuição, como roedores (Ben Faleh *et al.*, 2012), peixes não migratórios (Santos *et al.*, 2009) e plantas (Qiu *et al.*, 2011) em geral possuem genealogias populacionais

altamente divergentes e congruentes com a distribuição das suas populações no espaço geográfico.

O aumento do poder computacional e a disponibilidade de ferramentas estatísticas computacionais criaram, nos últimos anos, a oportunidade de recuperar linhagens coalescentes a partir de sequências de DNA das populações atuais. A filogeografia nas primeiras décadas do século XXI utiliza a inferência de tempo de divergência das linhagens coalescentes, que é estimado a partir de parâmetros da evolução molecular estabelecidos *a priori* da construção das genealogias. Hoje, a tendência é investigar quais os processos micro e macroevolutivos, que nas escalas temporal e espacial, contribuíram com o padrão biogeográfico observado (Hickerson *et al.*, 2010).

Os estudos dos padrões de distribuição geográfica de peixes na região neotropical foram inicialmente baseados em caracteres morfológicos (Ihering, 1891; Eigenmann, 1909; Haseman, 1912) e recentemente abordagens moleculares e citogenéticas têm incorporado novas interpretações a estas análises (Hubert *et al.*, 2007; Willis *et al.*, 2010; Albert & Reis, 2011; Pereira *et al.*, 2013). Os peixes obrigatoriamente dulcícolas são excelentes modelos para estudos filogeográficos, pois são restritos ao ambiente de água doce, permitindo estabelecer umnexo causal entre seus padrões de distribuição e os eventos paleohidrológicos como conexão de bacias hidrográficas, introgressões marinhas no continente, isolamentos de drenagens e capturas de cabeceiras. Linhagens genealógicas relacionadas de peixes de água doce, presentes em bacias hidrográficas hoje isoladas, indicam que estes sistemas hidrográficos tiveram continuidade física no passado. Estes padrões de distribuição de táxons monofiléticos podem ser corroborados com a existência de padrões coincidentes de organismos aquáticos não-relacionados, regiões de endemismos de

espécies de peixes e, em alguns casos, com a distribuição de organismos terrestres. A concordância destes padrões é geralmente explicada pela história paleohidrológica da região (Nelson & Platnick, 1981).

O elevado número de espécies de peixes dulcícolas, a presença de espécies com ampla distribuição, a baixa vagilidade de alguns táxons e a complexa história paleohidrológica das drenagens fluviais da América Central e do Sul fazem da região neotropical um desafio formidável para traçar padrões filogeográficos da ictiofauna.

1.2 Hoplias malabaricus é um complexo de espécies com características ideais para estudos filogeográficos

Dentre as poucas espécies de peixes de ampla distribuição na região neotropical encontra-se *Hoplias malabaricus*, um Characiforme da família Erythrinidae que é registrado da Argentina até a Costa Rica, popularmente conhecido como traíra (Oyakawa, 2003). *Hoplias malabaricus* é um peixe predador carnívoro que habita ambientes lênticos e não possui hábitos migratórios. Possui o corpo com coloração variando de parda a marron, possui um leve prognatismo da boca (Britski *et al.*, 1988), não possui nadadeira adiposa, possui o corpo com listras irregulares e a parte inferior da cabeça marmoreada. As nadadeiras dorsais, anais e caudais também possuem listras escuras alternadas com claras e as nadadeiras peitorais são manchadas. A fecundação é externa com desova parcelada e é um peixe que possui cuidado parental.

Hoplias malabaricus é bem adaptada a viver em pequenas e isoladas populações o que facilita a fixação estocástica de rearranjos cromossômicos (Santos

et al., 2009). Este é um dos táxons de peixes mais estudado citogeneticamente e apresenta sete distintos cariomorfos, os quais variam de 39 a 42 cromossomos com diferentes sistemas de cromossomos sexuais (Bertollo *et al.*, 2000). Desde os estudos citogenéticos iniciais realizados na década de 1970 (Bertollo *et al.*, 1979), *H. malabaricus* é considerado um complexo de espécies crípticas e estudos utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear, os quais têm demonstrado uma elevada distância molecular entre populações com diferentes cariomorfos, corroboram com esta hipótese (Bertollo *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2013).

A taxonomia envolvendo as traíras do complexo de espécies *Hoplias malabaricus* é difícil, confusa e com históricos equívocos. Bloch em 1794 indicou os rios da região de Tranquebar, costa do Malabar, na Índia, como a localidade tipo deste táxon. Contudo, evidências circunstanciais indicam que o material-tipo utilizado por Bloch seja do Suriname, pois grande parte das espécies de peixes neotropicais descritas por este autor provinham do Suriname e não existem peixes da família Erythrinidae na Índia (Paepke, 1999; Oyakawa, 2003). Na descrição original feita por Bloch (1794) o atual táxon *Hoplias malabaricus* foi denominado *Esox malabaricus*. No início do século XIX, Bloch e Schneider (1801) renomearam *Esox malabaricus* para *Synodus malabaricus* e em meados deste mesmo século Müller (1842) descreveu o gênero *Macrodon* para abrigar *Macrodon trahira*, um sinônimo sênior de *Esox malabaricus*. Na segunda metade do século XIX, Gill (1858) descreveu *Macrodon ferox* com base em exemplares coletados na ilha de Trinidad, território de Trinidad e Tobago; e Günther (1864) descreveu *Macrodon microlepis*, utilizando quatro espécimes coletados no oeste do Equador e três coletados no Panamá. O epíteto *Hoplias* só foi estabelecido no início do século XX por Gill (1903), em decorrência do crânio das espécies desse gênero assemelhar-se a uma

armadura defensiva e os dentes serem claramente adaptações ao ataque às presas. Esta mudança do epíteto do gênero de *Macrodon* para *Hoplias* foi justificada baseado no fato de *Macrodon* já ser utilizado para designar um gênero de peixes Sciaenidae (Bifi, 2013).

Atualmente, dentro do grupo *Hoplias malabaricus* são reconhecidas três espécies válidas, segundo Oyakawa (2003) e Bifi (2013): (1) *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974), a qual possui ampla distribuição neotropical com registros da Argentina até a Costa Rica, exceto nas bacias costeiras sulamericanas ao oeste dos Andes, (2) *Hoplias microlepis* (Günther, 1864) encontrada nas bacias costeiras ao oeste dos Andes e nas drenagens do Panamá que desaguam no oceano Pacífico e (3) *Hoplias teres* (Valenciennes, 1847) aparentemente restrita ao lago Maracaibo. Estas espécies do grupo *Hoplias malabaricus* diferenciam-se das espécies do grupo irmão *Hoplias lacerdae* por apresentarem as margens mediais dos dentários convergindo em direção à sínfise mandibular, por apresentarem quatro poros do sistema látero-sensorial do dentário e placas de dentes presentes no basi-hial e nos basi-branquiais (Oyakawa, 1990). Outra característica diagnóstica do complexo *H. malabaricus* é a aparência da região gular, onde neste táxon a linha dentaria converge em forma de “V” com o vértice apontando para a sínfise mandibular, enquanto em *H. lacerdae* estas linhas são aproximadamente paralelas e não se encontram na região sinfisiana (Britski *et al.*, 1972)

Uma recente revisão taxonômica em espécimes de populações do complexo *Hoplias malabaricus* foi realizada por Bifi (2013), o qual sugere a existência de cinco espécies, residentes na bacia hidrográfica do rio da Prata, dentro deste táxon nominal: (1) *Hoplias* sp. A distribuída nos rios Paraguai e Paraná, (2) *Hoplias* sp. B distribuída no alto rio Paraná, (3) *Hoplias* sp. C distribuída nos rios Iguazu e

Uruguai, (4) *Hoplias* sp. D distribuída nos rios Paraguai, Uruguai e baixo Paraná e (5) *Hoplias* cf. *malabaricus* distribuída nos rios Paraná e Uruguai.

Em decorrência da recente revisão taxonômica das espécies do grupo *Hoplias malabaricus* realizada por Bifi (2013) não ser considerada uma publicação formal, segundo as normas do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, não foram utilizadas, nesta tese, as designações de espécies sp. A, sp. B, sp. C e Sp.D. Neste trabalho foram designados como pertencentes ao táxon *H. malabaricus* todos os espécimes que possuem características fenéticas que permitem incluí-los no complexo de espécies *Hoplias malabaricus*.

1.3 A utilização do gene mitocondrial ATPase6 e nuclear RAG2 e de informações citogenéticas para estabelecer as relações genealógicas entre as populações de Hoplias malabaricus

Para um melhor conhecimento da filogeografia, taxonomia e sistemática das espécies presentes dentro do complexo *Hoplias malabaricus* é preciso uma integração de estudos anatômicos, fisiológicos, genéticos e biogeográficos. Sequências de DNA mitocondrial ATP sintase 6 (*ATPase6*) têm sido utilizadas com sucesso para recuperar as relações genealógicas e a biogeografia histórica das populações de *H. malabaricus*. Uma forte correlação entre os padrões filogeográficos baseados na variação do gene *ATPase6* das populações de *H. malabaricus* e a similaridade da ictiofauna não relacionada tem sido interpretada como reflexo da história paleohidrológica das regiões estudadas na filogeografia utilizando este gene (eg. Santos *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2013). Portanto, este gene foi utilizado como um marcador mitocondrial neste trabalho.

Embora as primeiras análises filogeográficas tenham sido inicialmente baseadas em polimorfismos do DNA mitocondrial (mtDNA), devido à sua herança uniparental (matrilinear) e ausência de recombinação (*crossing over*), a análise conjunta de marcadores nucleares e mitocondriais têm importante contribuição na elaboração das hipóteses filogeográficas (Avice, 2009). Uma genealogia baseada em mtDNA pode ser suficiente para recuperar eventos de dispersão em populações de espécies em que a taxa de dispersão é a mesma para ambos os sexos. No entanto, quando existe diferenças nas taxas de dispersão entre machos e fêmeas, a análise conjunta de informações provenientes de DNA uniparental (mtDNA) e nucleares, permite recuperar hipóteses mais robustas em relação à história de dispersão e vicariância das linhagens (Avice *et al.*, 2009). Somado aos dados moleculares, a utilização de informações citogenéticas (número diploides, localizações e número de sítios de DNA ribossomais, sondas de microssatélites, regiões heterocromáticas) que também são marcadores nucleares podem contribuir com o reconhecimento de padrões filogeográficos e com a compreensão dos processos microevolutivos responsáveis por este padrão (Silva *et al.*, 2012).

O gene nuclear ativador de recombinação 2 (*RAG2*) possui baixa taxa de substituição nucleotídica, sendo um bom marcador genético para recuperar as relações filogenéticas entre os ramos ancestrais das árvores filogenéticas (Lovejoy & Collette, 2001). Em *Hoplias malabaricus*, a utilização de sequências *RAG2* tem permitido resolver as relações genealógicas entre nós ancestrais das árvores filogenéticas construídas por inferência bayesiana e máxima parcimônia (eg. Pereira *et al.*, 2013) e, neste trabalho, este gene foi utilizado junto com as informações citogenéticas disponíveis como marcadores nucleares.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar os padrões filogeográficos de *Hoplias malabaricus* das bacias hidrográficas da América do Sul, utilizando sequências de DNA (mitocondrial e nuclear) e dados citogenéticos, incluindo os resultados no contexto paleohidrológico e de distribuição da ictiofauna nessa região.

2.2 Específicos

- Testar a hipótese que os eventos geomorfológicos e paleoclimáticos que determinaram os limites entre as bacias hidrográficas da América do Sul são os responsáveis pelo padrão de distribuição das populações e cariomorfos de *Hoplias malabaricus*.
- Testar a hipótese que as bacias hidrográficas com maior similaridade da ictiofauna possuem populações de *Hoplias malabaricus* com relações genealógicas mais próximas.
- Testar a hipótese que o tempo de divergência molecular entre as populações de *Hoplias malabaricus* presentes em bacias hidrográficas contíguas corresponde aos principais eventos geomorfológicos e paleoclimáticos que determinaram os limites entre estes sistemas hidrográficos.

- Testar a hipótese que as relações genealógicas entre as populações de *Hoplias malabaricus* são explicadas pela história paleohidrológica das bacias hidrográficas da América do Sul.
- Testar a hipótese que eventos vicariantes e de dispersão foram igualmente importantes para determinar a distribuição das populações de *Hoplias malabaricus* na América do Sul.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, J.S. & Reis, R.E. (2011) Introduction to Neotropical Freshwaters. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis). University of California Press, Berkeley, EUA.
- Avise, J.C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York, EUA.
- Avise, J.C. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, **36**, 3-15.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489-522.
- Ben Faleh, A.R., Granjon, L., Tatard, C., Ben Othmen, A., Said, K. & Cosson, J.F. (2012) Phylogeography of the Greater Egyptian Jerboa (*Jaculus orientalis*) (Rodentia: Dipodidae) in Mediterranean North Africa. *Journal of Zoology*, **286**, 208-220.
- Bertollo, L.A.C., Born, G.G., Dergam, J.A., Fenocchio, A.S. & Moreira-Filho, O. (2000) A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of karyomorphs and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, **8**, 603-613.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. (1979) Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, **2**, 17-37.

- Bifi, A.G. (2013) *Revisão taxonômica das espécies do grupo Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) (Characiformes: Erythrinidae) da bacia do rio da Prata*. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.
- Bloch, M.E. (1794) *Naturgeschichte der ausländischen Fische*. Berlin, Alemanha.
- Bloch, M.E. & Schneider, J. G. (1801) *M. E. Blochii, Systema Ichthyologiae iconibus cx illustratum. Post obitum auctoris opus inchoatum absolvit, correxit, interpolavit Jo. Gottlob Schneider, Saxo*. Berolini. Sumtibus Austoris Impressum et Bibliopolio Sanderiano Commissum.
- Britski, H.A. (1972) Peixes de água doce do estado de São Paulo: Sistemática. *Poluição e Piscicultura* (ed. por S.M. Branco) pp. 79-108. Faculdade de Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca. São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Britski, H.A., Sato, Y. & Rosa, A.B.S. (1988) *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias*. Coordenação de Publicações/CODEVASF, Divisão de Psicultura e Pesca, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- Eigenmann, C.H. (1909) The fresh water fishes of Patagonia and an examination of the Archiplata-Archelenis Theory. *Reports of the Princeton University expeditions to Patagonia 1896-1899* (ed. por W.B. Scott). E. Schweizerbart, Stuttgart, Alemanha.
- Gill, T.N. (1858) Synopsis of the fresh water fishes of the western portion of the island of Trinidad, W. I. *Annals of the Lyceum of Natural History of New York*, **6**, 363-430.
- Gill, T.N. (1903) A new name (*Hoplias*) for the genus *Macrodon* of Müller. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, **16**, 49-52.
- Günther, A. (1864) *Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae,*

Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiidae in the collection of the British Museum. Trustees, Londres, Reino Unido.

Haseman, J.D. (1912) Some factors of geographical distribution in South America.

Annals of the New York Academy of Sciences, **22**, 9-112.

Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, D.A., Graham, C.H.,

Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F. & Yoder, A.D. (2010)

Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000.

Molecular Phylogenetics and Evolution, **54**, 291-301.

Hubert, N., Duponchelle, F., Nunez, J., Da Vila, C.G., Paugy, D. & Renno, J.F.

(2007) Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*:

implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular*

Ecology, **16**, 2115-2136.

Ihering, H.V. (1891) On the ancient relations between New Zealand and South

America. *Transactions and Proceedings of the New Zealand Institute*, **24**, 431-

445.

Lovejoy, R.N. & Collette, B.B. (2001) Phylogenetic relationships of New World

needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions

between marine and freshwater habitats. *Copeia*, **2001**, 324-338.

Müller, J.W. Von. (1842) Beobachtungen über die Schwimmblase der Fisch, mit

Bezug auf einige neue Fishgattungen. *Archiv für Anatomie, Physiologie, und*

wissenschaftliche Medicin, **1842**, 307-329.

Nelson, G. & Platnick, N.I. (1981) *Systematics and biogeography: cladistics and*

vicariance. Columbia University Press, New York, EUA.

- Oyakawa, O.T. (1990) *Revisão sistemática das espécies do gênero Hoplias (grupo lacerdae) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil (Teleostei: Erythrinidae)*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Oyakawa, O.T. (2003) Family Erythrinidae. *Check list of the freshwater fishes of South America* (ed. por R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr), pp. 238-240. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Paepke, H.J. (1999) *Bloch's fish collection in the Museum für Naturkunde der Humboldt Universität zu Berlin – An illustrated catalog and historical account*. A. R.G. Gantner Verlag KG, República Checa.
- Pereira, T.L., Santos, U., Schaefer, C.E., Souza, G.O., Paiva, S.R., Malabarba, L.R., Schmidt, E.E. & Dergam, J.A. (2013) Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *Journal of Biogeography*, **40**, 905-914.
- Qiu, Y.X., Fu, C.X. & Comes, H.P. (2011) Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **59**, 225-244.
- Santos, U., Völcker, C.M., Belei, F.A., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Paiva, S.R. & Dergam, J.A. (2009) Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, **75**, 2326-2343.
- Silva, P.C., Santos, U., Travenzoli, N.M., Zanuncio, J.C., Cioffi, M.B. & Dergam, J.A. (2012) The unique karyotype of *Henochilus wheatladii*, a critically

endangered fish living in a fast-developing region in Minas Gerais State, Brazil. *Plos One*, **7**, e42278.

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

I. CAPITULO 1: FILOGEOGRAFIA DE *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS AMAZONAS E PARAGUAI

1. RESUMO

Objetivo Testar a hipótese que a evolução e diversificação das populações de *Hoplias malabaricus* dos rios Amazonas e Paraguai foram direcionadas pelos eventos paleohidrológicos que determinaram os limites entre estas bacias hidrográficas.

Localização Tributários dos rios Magdalena e Orinoco; rio Caroni (ilha de Trinidad); tributários das sub-bacias amazônicas: Solimões, Madeira, Guaporé, Tapajós, Xingu; rio Araguaia (afluente do rio Tocantins); calha e tributários do rio Paraguai e Uruguai.

Métodos Cento e vinte e um espécimes foram analisados. As análises de inferência bayesiana e máxima parcimônia foram realizadas com base na variação do gene mitocondrial ATP sintase 6 (*ATPase6*), utilizando o modelo de evolução molecular mais adequado obtido com o programa MrModeltest. As redes de haplótipos com os genes *ATPase6* e nuclear ativador de recombinação 2 (*RAG2*) foram construídas utilizando o software Network 4.6.1.1. A estimativa de tempo de divergência entre os haplogrupos foi realizada utilizando as sequências do gene *ATPase6* no software BEAST 1.5.1.

Resultados As análises moleculares indicaram quatro haplogrupos: alto Magdalena, baixo Magdalena, Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai. Simpatría de haplótipos dos haplogrupos Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai foi observada nas populações coletadas nos divisores de águas entre as bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Paraguai. O relógio molecular indicou divergência miocênica entre os haplogrupos Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai com dispersões entre as bacias dos rios Amazonas e Paraguai ocorrendo após o início do Plioceno. As populações

amazônicas com haplótipos do haplogrupo Amazonas/Orinoco presentes nas porções altas do Escudo Cristalino Brasileiro apresentaram elevada distância molecular das populações coletadas nas terras baixas amazônicas. O haplogrupo Amazonas/Orinoco apresentou populações com número diploide ($2n$) de 40 e 42 cromossomos, enquanto as populações do haplogrupo Paraguai/Uruguai têm $2n=40$ cromossomos.

Principais conclusões O tempo de divergência molecular de 19 milhões de anos (Ma) sugere que a vicariância entre as populações Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai foi determinada pela orogênese andina, representada na região de estudo pelo divisor de águas formação Chaparé. O tempo de divergência molecular de 8 Ma entre a população do rio Orinoco e as populações amazônicas é congruente com o período de formação do arco Vaupés (10 - 8 Ma), que separou o paleo-Amazonas-Orinoco nas modernas drenagens do rio Amazonas e Orinoco. Eventos recorrentes e bidirecionais de dispersão entre as drenagens de cabeceira dos rios Amazonas e Paraguai permitiram o fluxo gênico entre as populações destes sistemas hidrográficos e criaram uma zona simpátrica de haplótipos Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai. A maior distância molecular entre populações dentro de uma mesma bacia hidrográfica, quando comparado com populações presentes em bacias vizinhas, alerta para os riscos de considerar, *a priori*, bacias como unidades biogeográficas, induzindo a interpretações equivocadas na elaboração de relógios moleculares. A correlação entre os dados moleculares e cromossômicos, no contexto geográfico, sugere que as traíras *Hoplias malabaricus* passaram por reduções independentes no número diploide de $2n=42$ para $2n=40$ cromossomos, ou ocorreu fluxo gênico entre espécimes com o número diplóide diferente.

2. INTRODUÇÃO

A ictiofauna neotropical iniciou sua diversificação na Gondwana, com representantes das ordens Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes e Perciformes presentes na América do Sul e África. Estima-se que as Américas Central e do Sul abrigam 20% de todas as espécies de peixes de água doce do mundo, representando 10% de todos os vertebrados (Vari & Malabarba, 1998). São reconhecidas 43 famílias endêmicas dessa região (Reis *et al.*, 2003), um provável reflexo da história paleohidrológica e da diversificação de habitat ocorridos nos últimos 110 milhões de anos de isolamento com a África (Albert & Reis, 2011).

A bacia amazônica é centro de diversidade de peixes de água doce nos neotrópicos, abrigando 2.173 espécies (38% das espécies conhecidas) distribuídas em 6,92 milhões de km² no norte e centro da América do Sul (Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia). Grande parte desse sistema hidrográfico é formada por terras baixas com cabeceiras de pequenas altitudes (Albert *et al.*, 2011). O sul da bacia amazônica faz divisa com afluentes do rio Paraguai, o qual possui duas importantes ecorregiões para peixes de água doce (Chaco e Paraguay) (Abell *et al.*, 2008). A bacia do rio Paraguai possui 333 espécies (Reis *et al.*, 2003), em uma área de 1,1 milhão de km² no sul e centro da América do Sul. Possui cabeceiras no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina desaguando no rio Paraná (Carvalho & Albert, 2011). A união dos rios Paraná e Uruguai forma o rio da Prata, o qual deságua no Atlântico.

As proporções continentais e conseqüente heterogeneidade em estrutura de habitat (altitude, gradiente de correnteza, regime de chuvas, temperatura, floresta de cobertura e tipo de solos) são os principais fatores que permitem o abrigo dessa rica ictiofauna na região amazônica (Olson *et al.*, 1998) e no rio Paraguai. Datações

baseadas em relógios moleculares e registros fósseis sugerem que a radiação dos Characiformes (Calcagnotto *et al.*, 2005), Siluriformes (Sullivan *et al.*, 2006), Cichlidae (Smith *et al.*, 2008) e Poeciliidae (Doadrio *et al.*, 2009) amazônicos ocorreu no final do Cretáceo ou início do Paleógeno (Lundberg *et al.*, 2010), quando o sistema de rios do Proto-Amazonas drenava principalmente para o oeste (Cretáceo - início do Cenozóico). Posteriormente, uma divisão leste-oeste da bacia iniciou no Oligoceno, em decorrência do soergimento do arco Purús, ligeiramente a oeste da cidade de Manaus (Lundberg, 1998). O Neógeno (23 até 1,8 milhões de anos - Ma) foi o período de grande atividade tectônica e de transporte de sedimentos oriundos dos Andes, os quais levaram a complexas mudanças no curso das drenagens na região das modernas bacias dos rios Orinoco, Amazonas e Paraguai (Wesselingh & Hoorn, 2011). Devido à ictiofauna amazônica já ser similar à atual no início do Neógeno, é provável que as mudanças hidrogeográficas, climáticas e de habitat nesse período contribuíram mais com a diminuição da taxa de extinção do que com a promoção da especiação dos peixes neotropicais (Lundberg, 1998; Albert *et al.*, 2011).

A formação das modernas bacias hidrográficas dos rios Orinoco, Amazonas e Paraguai ocorreu no Neógeno (11-7 Ma.) (Wesselingh & Hoorn, 2011) e gêneros atuais como *Phractocephalus* (Hardman & Lundberg, 2006) e *Hoplosternum* (Reis, 1998), assim como *Colossoma macropomum* possuem registros fósseis do médio Mioceno (12 Ma.), sugerindo que os gêneros e famílias dos peixes que habitam essa região são anteriores à atual configuração dessas bacias (Albert *et al.*, 2011). A semelhança da ictiofauna entre os rios Orinoco, Amazonas e Paraguai é reconhecida historicamente por inventários de fauna (Humboldt & Bonpland, 1811; Eigenmann 1906; Pearson, 1937; Carvalho & Albert, 2011) e os eventos de dispersão entre estas

bacias são corroborados por registros fósseis (eg. Reis, 1998) e técnicas moleculares (eg. Montoya-Burgos, 2003; Hubert *et al.*, 2007a).

Desde os trabalhos seminais realizados por Pearson (1937): “*The Fishes of the Beni-Mamoré and Paraguay Basins, and a Discussion of the Origen of the Paraguayan Fauna*” a origem de parte da ictiofauna da bacia hidrográfica do rio Paraguai a partir de tributários de cabeceira ao sul da bacia amazônica é reconhecida. A bacia do rio Paraguai possui mais de 2.800 km de divisores de águas com sub-bacias amazônicas (950 km com o Mamoré, 669 km com o Tocantins, 650 km com o Tapajós e 612 km com o Guaporé). Toda essa região é composta por altitudes entre 200 a 300 metros, favorecendo eventos de capturas de cabeceira (Albert *et al.*, 2011). Os pequenos charcos, a dinâmica de sedimentos oriundos dos Andes e a baixa altitude na região favorecem recorrentes intercâmbios de fauna entre os tributários amazônicos e do rio Paraguai (Barnes & Heins, 2009).

Estudos filogeográficos com espécies de peixes sedentárias e de ampla distribuição permitem recuperar eventos de dispersão e vicariância que ocorreram entre drenagens vizinhas em diferentes momentos da história paleohidrológica (e.g. Pereira *et al.*, 2013). Dentre as poucas espécies de ampla distribuição na região neotropical, destaca-se o caraciforme *Hoplias malabaricus* (traíra), uma espécie sedentária que ocupa 41 ecorregiões de peixes de água doce (Abell *et al.*, 2008), com registros da Argentina à Costa Rica (Oyakawa, 2003). Desde os trabalhos realizados por Dergam e colaboradores (1998), *H. malabaricus* tem se mostrado um organismo modelo para estudos das relações históricas entre as bacias hidrográficas neotropicais, com base em padrões citogenéticos (Jacobina *et al.*, 2009, 2011), de DNA mitocondrial (Santos *et al.*, 2009) e associando padrões citogenéticos com variação de DNA nuclear e mitocondrial (Pereira *et al.*, 2013).

Hoplias malabaricus é considerado um complexo de espécies desde os estudos citogenéticos realizados na década de 1970 (Bertollo *et al.*, 1979). Sete distintos cariomorfos (A-G) são reconhecidos, com diferentes números diploides, morfologias cromossômicas e presença de sistemas de cromossomos sexuais (Bertollo *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2009). Os cariomorfos com número diploide de 40 e 42 cromossomos meta e submetacêntricos, com ausência de sistema de cromossomos sexuais heteromórficos ($2n=40C$ e $2n=42A$, respectivamente), apresentam grande distribuição neotropical, incluindo as bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Paraguai. Os cariomorfos $2n=42E$ (42 cromossomos e morfologia cromossômica diferente do $2n=42A$) e $2n=40/41G$ (40 cromossomos nas fêmeas e 41 nos machos) são restritos à bacia hidrográfica amazônica (Bertollo *et al.*, 2000). O cariomorfo $2n=40F$ (40 cromossomos em ambos os sexos, sem sistema de cromossomo sexual heteromórfico) é distribuído nas bacias costeiras do leste, ao norte da Formação Abrolhos, e nos rios São Francisco e Amazonas (Bertollo *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2013). Apenas dois cariomorfos não foram coletados na região amazônica: $2n=42B$, com 42 cromossomos e sistema de cromossomos sexuais XY, restrito à bacia hidrográfica do rio Doce (Jacobina *et al.*, 2011) e a primeira porção do rio Iguaçu (Lemos *et al.*, 2002); e o cariomorfo $2n=39/40D$ com 39 cromossomos nas fêmeas e 40 cromossomos nos machos, limitado à bacia hidrográfica do alto rio Paraná (Bertollo *et al.*, 2000). A nomenclatura quanto à classificação dos cariomorfos utilizada neste trabalho seguirá Bertollo e colaboradores (2000).

O objetivo desse trabalho foi analisar os padrões de divergência genética em populações de *Hoplias malabaricus* das bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Paraguai, comparando os resultados com a distribuição da ictiofauna não relacionada e discutindo os cenários paleohidrológicos consistentes com esse padrão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A permissão de coleta no Brasil foi fornecida ao professor Jorge A. Dergam pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) (SISBIO14975-1). As traíras *Hoplias malabaricus* foram coletadas em três pontos amostrais na bacia hidrográfica do rio Magdalena, em uma localidade na bacia hidrográfica do rio Orinoco, no rio Caroni (ilha de Trinidad), em 20 pontos amostrais na bacia hidrográfica do rio Amazonas, no rio Araguaia, em sete localidades na bacia do rio Paraguai e em três na bacia do rio Uruguai (Tabela I. 1). As amostras de tecidos utilizadas neste estudo estão depositadas no Laboratório de Sistemática Molecular Beagle da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Hoplias australis*, *Hoplias intermedius* e *Hoplias lacerdae* foram utilizadas como grupo externo. Os espécimes testemunhos foram depositados no Museu de Zoologia João Moojen na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Tabela I.1 Amostras de tecidos de *Hoplias malabaricus* depositadas no Laboratório de Sistemática Molecular Beagle (UFV) utilizadas, coordenadas geográficas e locais de coleta

Bacia hidrográfica	Identificação da amostra	Coordenadas GPS	Local
Uruguai	9503	S 29° 44' 20'' W 57° 05' 21''	Rio Uruguai, Uruguiana – RS, Brasil.
Uruguai	9508	S 30° 14' 10'' W 54° 55' 00''	Rio Santa Maria, Rosário do Sul – RS, Brasil.
Uruguai	AL21; AL27; AL48; AL50; AL53; AL54; AL63	S 29° 04' 54'' W 56° 36' 14''	Rio Aguapey, província de Corrientes, Argentina.
Paraguai	CPAP1; CPAP3; CPAP5; CPAP7	S 18° 59' 02'' W 57° 39' 32''	Rio Paraguai, Corumbá – MS, Brasil
Paraguai	JD3916	S 16° 03' 45'' W 57° 41' 42''	Rio Paraguai, Cáceres – MT, Brasil
Paraguai	CP249; CP269; CP270; CP277	S 15° 04' 22'' W 57° 10' 12''	Pesqueiro Santa Fé, Barra do Bugre – MT, Brasil
Paraguai	B75; B76; B77; B81; B82	S 15° 05' 32'' W 57° 14' 92''	Rio Paraguai, Barra do Bugre – MT, Brasil
Paraguai	CP02; CP08; CP10; CP26;	S 14° 30' 07'' W 57° 34' 39''	Córrego São José, Tangará da Serra – MT, Brasil
Paraguai	CP11; CP17; CP167; JD3696; JD3702; JD3710	S 14° 48' 02'' W 57° 46' 29''	Rio Sepotuba, Tangará da Serra – MT, Brasil
Paraguai	CP464	S 15° 40' 48'' W 56° 04' 13''	Rio Cuiabá, Cuiabá – MT, Brasil
Amazonas	CP301; CP487	S 15° 12' 51'' W 59° 20' 31''	Rio Guaporé, Pontes e Lacerda – MT, Brasil
Amazonas	CP222; CP228; CP229; CP245	S 13° 19' 29'' W 57° 36' 17''	Rio Sangue, Campo Novo do Parecis – MT, Brasil
Amazonas	CP126; CP127; CP128; CP134; CP142; CP151; CP144; CP154	S 12° 57' 17'' W 58° 43' 42''	Fazenda Céu Azul, Sapezal – MT, Brasil
Amazonas	CP73; CP443; CP444; CP446	S 13° 11' 11'' W 56° 41' 18''	Rio Arinos, Sapezal – MT, Brasil
Amazonas	CP523; CP534;	S 12° 42' 03'' W 55° 45' 41''	Rio Teles Pires, Sorriso – MT, Brasil
Amazonas	AA126; AA127; AA130; AA131; MM2; MM3; MM4; MM5; MM6; OR8 MM13; MM14;	S 9° 38' 11'' W 56° 00' 25''	Rio Teles Pires, Alta Floresta – MT, Brasil
Amazonas	AA129; MM07; MM08	S 9° 42' 51'' W 55° 51' 01''	Lagoa Azul, Alta Floresta – MT, Brasil
Amazonas	JD4109; JD4110; JD4113; JD4586; JD4589; JD4600;	S 11° 24' 44'' W 61° 44' 11''	Rio Machado, Cacoal – RO, Brasil
Amazonas	JD2963	S 10° 53' 04'' W 61° 56' 28''	Rio Machado, Ji-Paraná – RO, Brasil
Amazonas	JD2916; JD2974	S 9° 35' 58'' W 64° 55' 06''	Rio Madeira, Porto Velho – RO, Brasil
Amazonas	JD2978	S 8° 32' 25'' W 63° 28' 01''	Rio Jamarí, Porto Velho – RO, Brasil

Tabela I.1 Continuação

Bacia hidrográfica	Identificação da amostra	Coordenadas GPS	Local
Amazonas	EE102; EE103; EE104; EE105; EE106	S 10° 9' 48'' W 59° 27' 12''	Jusante de Dardanelos, Aripuanã – MT, Brasil
Amazonas	WS45; WS62	S 6° 38' 55'' W 52° 0' 15''	Rio Xingu, Rio Maria – PA, Brasil
Tocantins	WS51; WS54; WS55; WS56; WS72; WS74	S 58° 52' 34'' W 49° 43' 14''	Rio Araguaia, Pau D'arco – PA, Brasil
Amazonas	EE100;	S 5° 12' 22'' W 60° 40' 46''	Lago Xadá, Novo Aripuanã – AM, Brasil
Amazonas	EE113, EE118; EE119	S 9° 35' 58'' W 64° 55' 06''	Rio Juruá, Juruá – AM, Brasil
Amazonas	MAM1	S 3° 19' 56'' W 64° 43' 55''	Rio Solimões, Tefé – AM, Brasil
Amazonas	JP2804	S 3° 04' 55'' W 60° 00' 11''	Rio Mindu, Manaus – AM, Brasil
Amazonas	JAU	S 3° 05' 52'' W 60° 01' 18''	INPA, Manaus – AM, Brasil.
Amazonas	JP2787	S 2° 27' 43'' W 58° 13' 10''	Rio Capucapu, Santa Maria – AM, Brasil
Amazonas	DM6	N 0° 02' 42'' W 51° 14' 37''	Rio Matapi, Macapá – AP, Brasil
Orinoco	W1; W2; W4; W5 W6	N 5° 30' 23'' W 60° 15' 19''	Caño Maraca, Estado Portuguesa, Venezuela
Caroni	K14; K15	N 10° 35' 13'' W 61° 20' 48''	Rio Caroni, norte de Trinidad, Trinidad-Tobago
Magdalena	NI1; NI2; NI3, NI4, NI5	N 2° 44' 75'' W 75° 25' 72''	Córrego La Boa, Yaguará, Huila, Colômbia.
Magdalena	NI11, NI12, NI13, NI14, NI15, NI16	N 10° 15' 28'' W 75° 11' 9''	Pantanal Zarzal, Mahates, Bolivar, Colômbia.
Magdalena	NI18, NI19	N 10° 24' 12'' W 75° 3' 2''	Pantanal Los Chivos, Manatí, Atlântico, Colômbia.

O DNA foi extraído a partir de tecidos fixados em etanol (fígado, músculo epaxial, ou filamentos branquiais) seguindo a metodologia de Boyce e colaboradores (1989). O gene mitocondrial ATP sintase 6 (*ATPase6*) foi amplificado com os iniciadores L8524 e H9236 (Quenouille *et al.*, 2004) e o gene nuclear ativador de recombinação 2 (*RAG2*) amplificado com os iniciadores RAG2aF e RAG2bR (Calcagnotto *et al.*, 2005). Em ambas as reações o DNA foi sintetizado em 50 µL de reação contendo 0,4 µL de dNTPs (20 mM), 5 µL de tampão de reação (200 mM

Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 0,4 µL de MgCl₂ (100 mM), 2 µL de cada iniciador (0,01 mM), 0,4 µL (2,5 U) de *Taq* DNA polimerase (Phonectria), 2 µL de DNA molde (100 ng/µL) e 37,8 µL de H₂O. Para *ATPase6*, as condições do PCR foram as seguintes: 94 °C (2 min), cinco ciclos de 94 °C (45 s), 54 °C (45 s) e 72 °C (1,5 min), e 29 ciclos de 94 °C (45 s), 58 °C (45 s) e 72 °C (1,5 min). Para *RAG2*, as condições de PCR seguiram: 95 °C (5 min), 30 ciclos de 95 °C (30 s), 48 °C (45 s), e 72 °C (1,5 min) com uma extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram purificados usando PEG 8000 (20% polyethyleneglycol, 2,5 M NaCl) e o sequenciamento realizado na plataforma de sequenciamento da Macrogen (Seoul, Coréia do Sul).

As sequências foram alinhadas com o CLUSTAL W (Higgins *et al.*, 1994) um implemento do MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). A qualidade de todas as sequências foi checada por observação direta dos cromatogramas em MEGA 5.0 e as sequências de má qualidade foram descartadas e o sequenciamento daquela amostra refeito. A inferência bayesiana foi feita com dez milhões de cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) no software BEAST 1.5.1 (Drummond & Rambaut, 2007) e a cada 1000 gerações foi realizada a amostragem de uma árvore. O modelo de evolução molecular que melhor se ajustou aos dados foi avaliado com o programa MrModeltest 2 (Nylander, 2004). Vinte e cinco por cento das primeiras gerações MCMC foram descartadas e as relações filogenéticas e probabilidades posteriores estimadas com as árvores restantes. As topologias com probabilidades posteriores maiores que 0,95 foram consideradas bem sustentadas (Wilcox *et al.*, 2002). A análise de máxima parcimônia foi realizada no PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). As buscas heurísticas consistiram em 1000 adições aleatórias das sequências utilizando o algoritmo TBR. O sinal filogenético foi estimado usando 1000 pseudorreplicações

de bootstrap (Felsenstein, 1985). A distância molecular média entre os haplótipos foi estimada em MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Os sítios polimórficos dos genes *ATPase6* e *RAG2* foram estimados utilizando o software DnaSP (Librado & Rozas, 2003) e as redes de haplótipos foram construídas com o software Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd.).

O tempo de divergência molecular foi estimado usando o gene *ATPase6* no software BEAST 1.5.1 (Drummond & Rambaut, 2007). A calibragem do relógio molecular foi baseada na idade mínima de separação da bacia hidrográfica do rio Magdalena das demais bacias hidrográficas localizadas ao leste da cordilheira oriental dos Andes, estimada em aproximadamente 12 milhões de anos (Hoorn *et al.*, 1995). Na bacia hidrográfica do rio Magdalena, a presença de dois haplogrupos altamente divergentes (distância molecular de 0,16) correspondentes às amostras coletadas nas porções alta e baixa da drenagem, permitiu duas calibrações do relógio molecular. Na primeira calibragem, assumiu-se que o evento cladogenético da cordilheira oriental dos Andes foi responsável pela divergência molecular entre a população de *H. malabaricus* da porção alta do rio Magdalena e as populações ao leste dos Andes. No segundo relógio molecular, assumiu-se que o mesmo evento determinou a divergência molecular entre as populações presentes na porção baixa do rio Magdalena e as populações ao leste dos Andes. O intervalo de confiança de 95% foi estabelecido nas duas calibrações. O Fator Bayes $2\ln$ foi calculado para as hipóteses filogenéticas com e sem relógio molecular estrito, usando o programa Tracer v.1.5.0 (Rambaut & Drummond, 2009). Este tipo de análise permitirá verificar se existem diferenças significativas entre as topologias construídas, no BEAST, utilizando o relógio estrito e sem considera-lo. Valores de Fator Bayes ≥ 10 foram considerados suficientes para rejeitar a hipótese nula (Kass & Raftery, 1995).

4. RESULTADOS

Foram alinhados 638 pb do gene *ATPase6* com 204 sítios variáveis e 163 sítios informativos para a parcimônia. A razão transição/transversão foi 5,03 sugerindo que as taxas de substituições não estão saturadas. O modelo de evolução molecular que melhor se ajustou aos dados foi HKY+I+G. O método de inferência bayesiana indicou quatro haplogrupos: (1) haplogrupo alto Magdalena; (2) haplogrupo baixo Magdalena; (3) haplogrupo Amazonas/Orinoco e (4) haplogrupo Paraguai/Uruguai. O método da máxima parcimônia gerou três haplogrupos, repetindo os haplogrupos alto Magdalena e Paraguai/Uruguai indicados pela análise bayesiana e um terceiro que englobou os haplogrupos do baixo Magdalena e Amazonas/Orinoco (Fig. 1 e 2). O haplogrupo alto Magdalena foi formado por espécimes coletados em Yaguará (N=5) a 154 km da nascente do rio Magdalena (lagoa da Magdalena, Macizo Colombiano). O haplogrupo baixo Magdalena foi composto por amostras coletadas nas localidades de Mahates (N=6) e em Manatí (N=2), distantes a 42 km e 70 km, respectivamente, do porto de Cartagena, no mar do Caribe.

O haplogrupo Amazonas/Orinoco foi formado por espécimes coletados na bacia hidrográfica amazônica (N=45), bacia hidrográfica do rio Orinoco (N=5), Caroni (N=2), Tocantins (N=6), Paraguai (N=3) e Uruguai (N=3). Os haplótipos coletados no rio Orinoco formaram um clado irmão da grande parte das populações do haplogrupo Amazonas/Orinoco, exceto às amostras coletadas nas cabeceiras do rio Teles Pires (Campo Novo do Parecis, Sorriso e Sapezal). Os espécimes coletados no rio Caroni, na ilha de Trinidad, apresentaram estreita relação filogenética com as populações do rio Amazonas (Manaus), Araguaia (Pau D' arco) e Capucapu (Santa Maria). Os espécimes coletados na bacia hidrográfica do rio Paraguai que

apresentaram haplótipos no haplogrupo Amazonas/Orinoco foram capturados em Barra do Bugre e Cuiabá, ambas as localidades próximas ao divisor de águas com a bacia amazônica. Três espécimes coletados no rio Aguapey, província de Corrientes, também apresentaram haplótipos mitocondriais neste haplogrupo (Fig. 2 e 3).

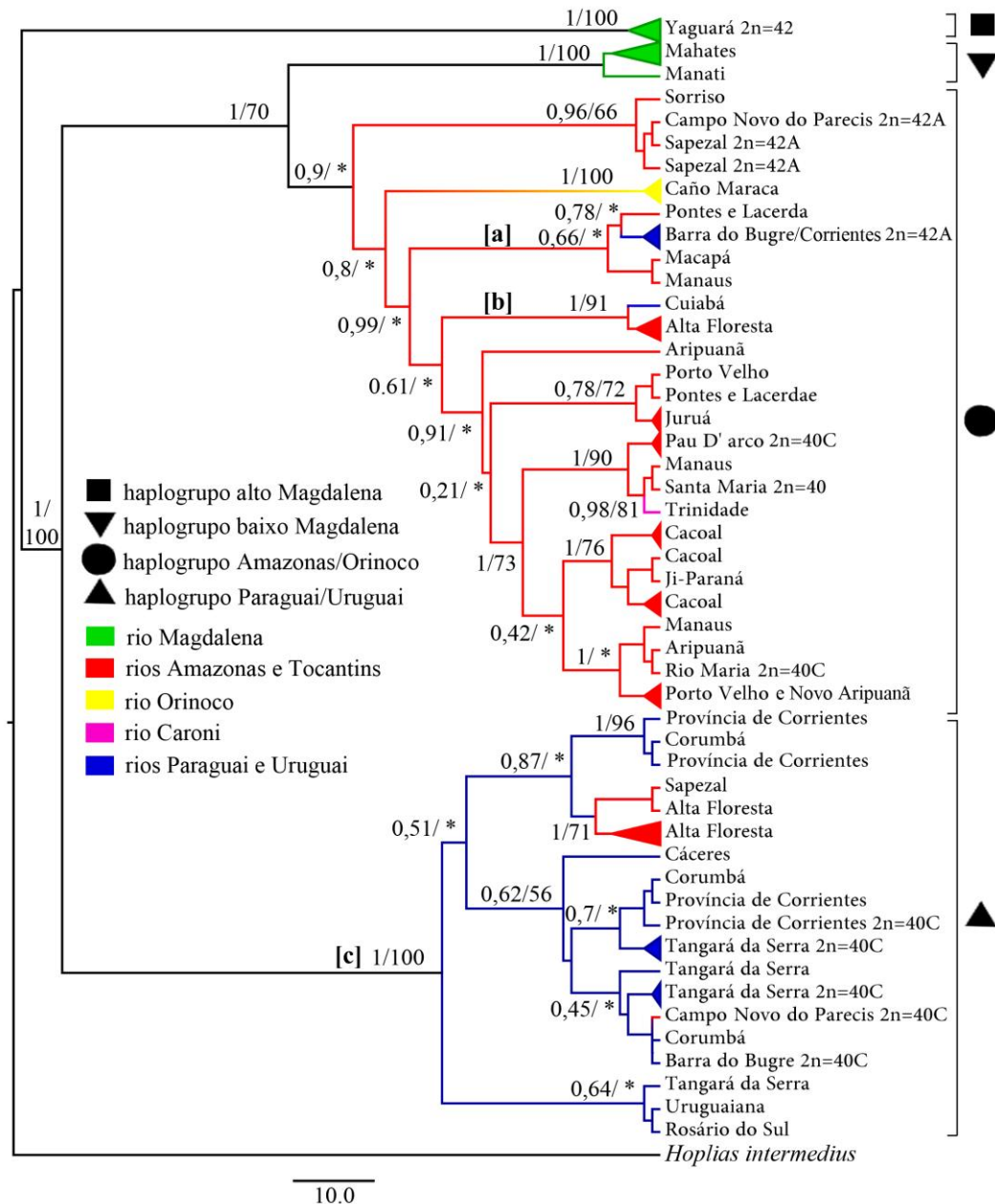
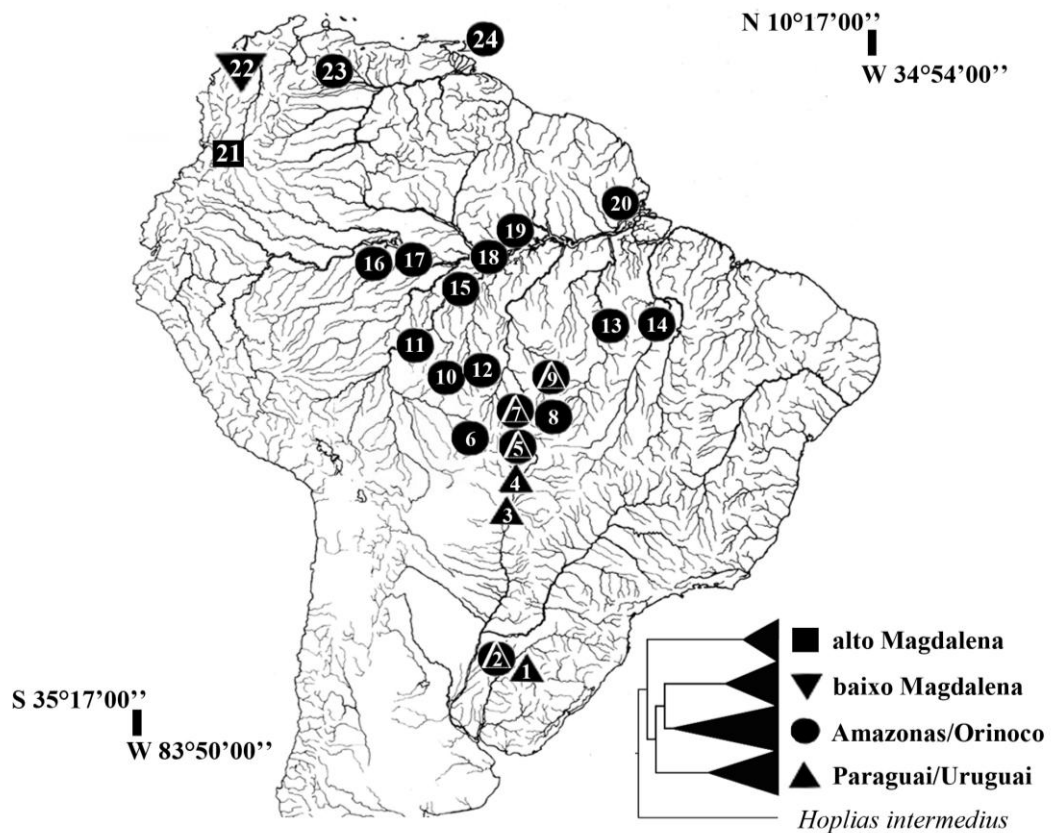


Figura I.1 Relações filogenéticas dos haplótipos *ATPase6* de *Hoplias malabaricus*. Topologia gerada por inferência bayesiana com valores estatísticos expressos em probabilidade posterior e bootstrap (máxima parcimônia), respectivamente. O código dos espécimes foi substituído pelo local de coleta. As cores dos ramos são correspondentes às bacias hidrográficas de coleta dos espécimes. Os asteriscos indicam politomias. [a], [b] e [c] indicam os clados nos quais os haplótipos foram

utilizados para a elaboração das redes de haplótipos apresentadas na figura 3. 2n representa o número diploide. Bar = distância molecular.



- | | |
|--|----------------------------------|
| 1 - Uruguaiana; Rosário do Sul - RS, Brasil | 13 - Rio Maria - PA, Brasil |
| 2 - Província de Corrientes, Argentina | 14 - Pau D'arco - PA, Brasil |
| 3 - Corumbá - MT, Brasil | 15 - Novo Aripuanã - AM, Brasil |
| 4 - Cáceres - MT, Brasil | 16 - Juruá - AM, Brasil |
| 5 - Barra do Bugre; Tangará da Serra; Cuiabá - MT | 17 - Tefé - AM, Brasil |
| 6 - Pontes e Lacerda - MT, Brasil | 18 - Manaus - AM, Brasil |
| 7 - Campo Novo do Parecis; Sapezal - MT, Brasil | 19 - Santa Maria - AM, Brasil |
| 8 - Sorriso - MT, Brasil | 20 - Macapá - AP, Brasil |
| 9 - Alta Floresta - MT, Brasil | 21 - Yaguará - HUI, Colômbia |
| 10 - Cacoal; Ji-Paraná - RO, Brasil | 22 - Mahates; Manatí, Colômbia |
| 11 - Porto Velho - RO, Brasil | 23 - Caño Maraca, Venezuela |
| 12 - Aripuanã - AM, Brasil | 24 - Trinidad, Trinidad e Tobago |
| ▲ - Simpatria de haplótipos dos haplogrupos ● e ▲. | |

Figura I.2 Distribuição dos haplogrupos de *Hoplias malabaricus* nas bacias hidrográficas dos rios Caroni (ilha de Trinidad), Magdalena, Orinoco, Amazonas, Tocantins, Paraguai e Uruguai.

Notar que as simpatrias de haplótipos dos haplogrupos Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai ocorrem principalmente em localidades próximas aos divisores de águas.

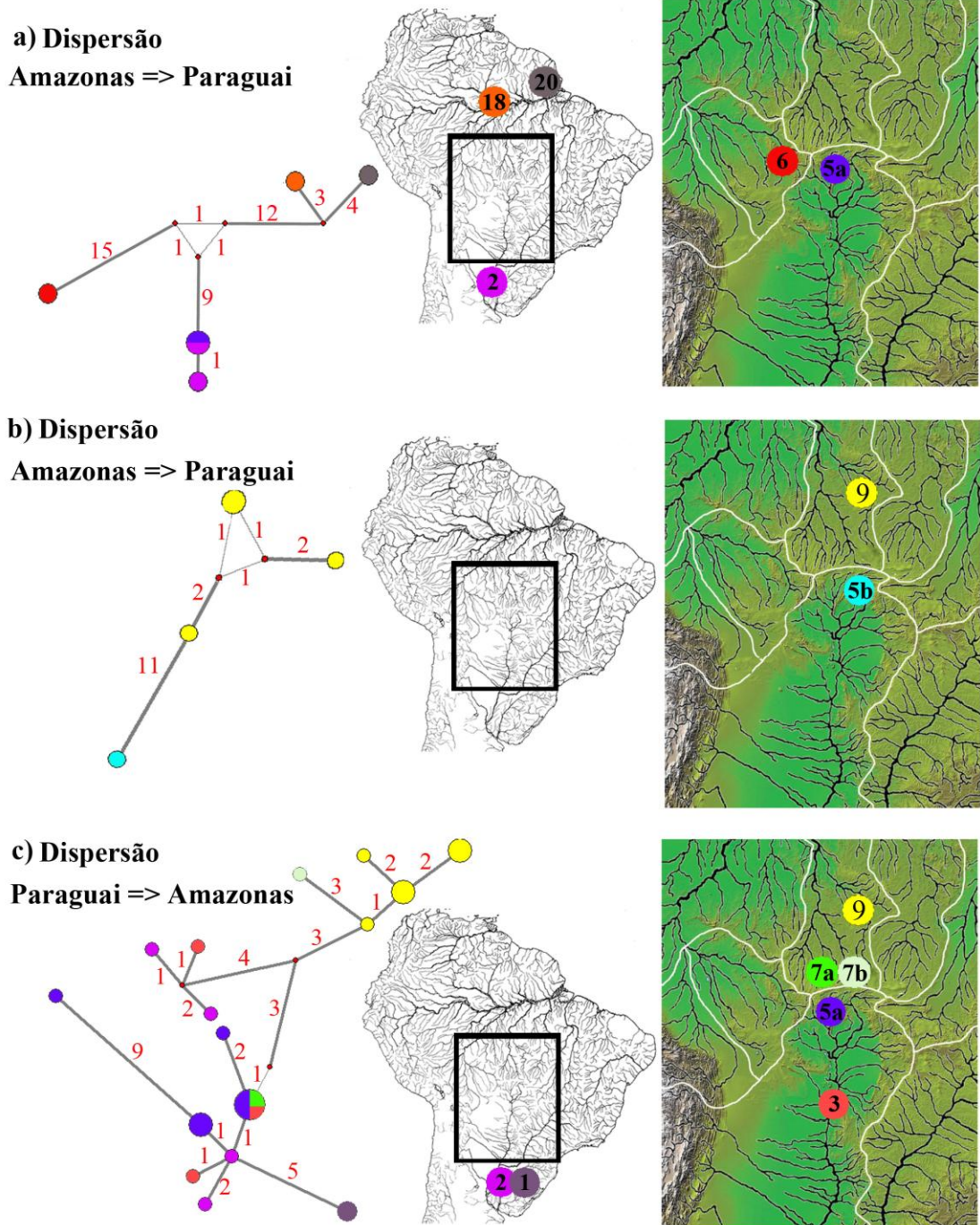


Figura I.3 Redes de haplótipos com o gene *ATPase β* representando as dispersões de *Hoplias malabaricus* entre as bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Paraguai. As redes de haplótipos a, b e c correspondem, respectivamente, às amostras presentes nos clados [a], [b] e [c] da figura 1. Os números em vermelho indicam o número de substituições nucleotídicas entre os haplótipos. Os pontos vermelhos representam os haplótipos não amostrados. As localidades amostradas (cidades) são representadas pelas respectivas cores na rede de haplótipos: (1) Uruguaiana e Rosário do Sul; (2) província de Corrientes; (3) Corumbá; (5a) Barra do Bugre e Tangará da Serra; (5b) Cuiabá; (7a) Campo Novo do Parecis; (7b) Sapezal; (8) Sorriso; (9) Alta Floresta; (12) Aripuanã; (18) Manaus; (20) Macapá. A linha branca no mapa indica os divisores de águas.

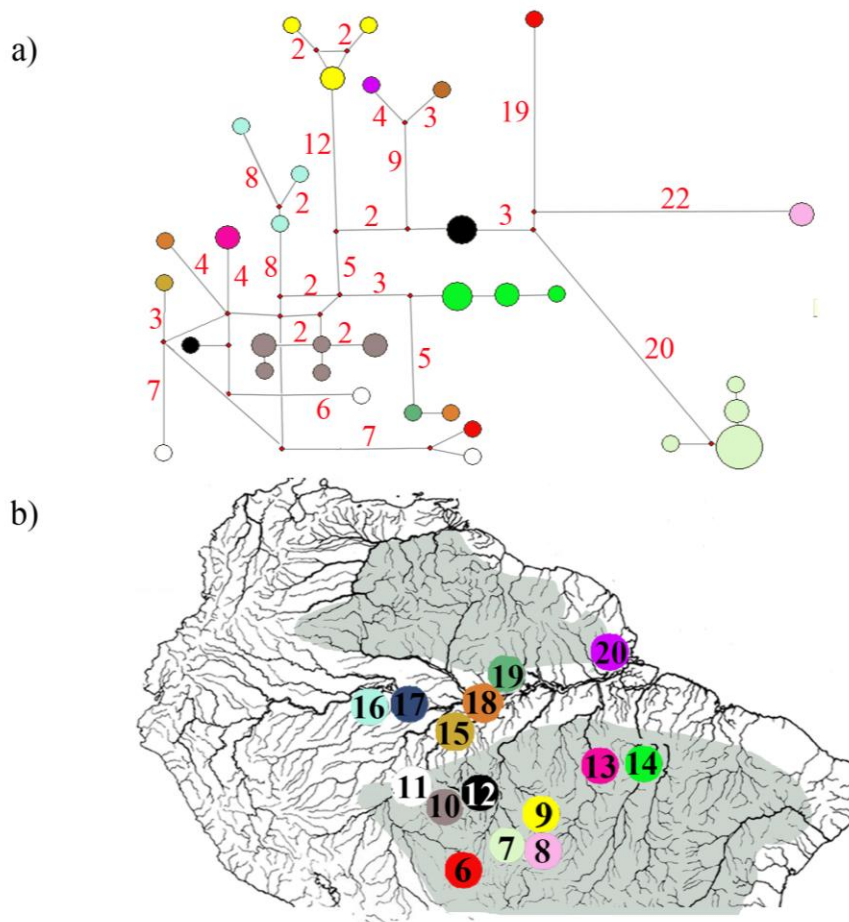
O haplogrupo Paraguai/Uruguai foi formado por espécimes capturados na bacia hidrográfica do rio Paraguai (N=22), do rio Uruguai (N=6) e espécimes de *Hoplias malabaricus* da bacia amazônica (N=16). Quatro destes últimos foram coletados em Sapezal, 11 em Alta Floresta e um em Campo Novo do Parecis. Todas estas localidades são próximas ao divisor de águas com a bacia hidrográfica do rio Paraguai. Os haplótipos coletados em Sapezal e Alta Floresta formaram um clado com alto valor de probabilidade posterior (1) e valor de bootstrap razoável (71) dentro do haplogrupo Paraguai/Uruguai (Fig. 1).

A rede de haplótipos com o fragmento *ATPase6* das amostras do haplogrupo Amazonas/Orinoco apresentou 43 haplótipos com grande diversidade nucleotídica (0,05) e haplotípica (0,978). Dentro desse haplogrupo, os espécimes coletados em Barra do Bugre (N=2) e na província de Corrientes (N=3) apresentaram elevado número de substituições nucleotídicas em relação aos haplótipos amazônicos aparentados (Fig. 3a). O haplótipo coletado no rio Cuiabá, possui 11 sítios de substituição em relação ao haplótipo amazônico mais relacionado, coletado em Alta Floresta (Fig. 3b). As populações das sub-bacias amazônicas Juruena (Campo Novo dos Parecis e Sapezal), Teles Pires (Alta Floresta e Sorriso) e Guaporé (Pontes e Lacerda), apresentaram haplótipos com elevado número de substituições em relação àqueles presentes em espécimes coletados em outras localidades dentro da bacia hidrográfica do rio Amazonas (Fig. 4). A distância molecular média destas localidades com outras porções da bacia amazônica também foi elevada, exceto para a população de Pontes e Lacerda, devido à presença de um haplótipo estreitamente relacionado à população de Porto Velho (Tabela 2 e Fig. 4).

O fragmento *ATPase6* das amostras do haplogrupo Paraguai/Uruguai apresentou 16 haplótipos com 0,011 de diversidade nucleotídica e 0,89 de

diversidade haplotípica. As populações de Alta Floresta e Sapezal agruparam-se de forma consistente com a distribuição geográfica. Um espécime coletado no rio Sangue, em Campo Novo dos Parecis, apresentou o haplótipo *ATPase6* que é amplamente distribuído nas cabeceiras do rio Paraguai (Barra do Bugre, Tangará da Serra e Corumbá) e estreitamente aparentado com as amostras da bacia hidrográfica do rio Uruguai (Fig. 3c).

As sequências *RAG2* foram obtidas dos espécimes coletados na bacia hidrográfica do rio Magdalena (N=13), na bacia hidrográfica do rio Uruguai (N=6), no alto rio Paraguai (N=25), na bacia hidrográfica amazônica (N=57), no rio Orinoco (N=5) e dos espécimes coletados na bacia hidrográfica do rio Tocantins (N=6). Foram alinhados 1.038 pb com 89 sítios variáveis, 60 sítios informativos para parcimônia e uma baixa razão média de transição/transversão (1,39). As razões de transição/transversão foram de 0,33 para a primeira base do códon, 1,18 para a segunda e 2,76 para a terceira base. A rede de haplótipos formou haplogrupos parcialmente congruentes com os sistemas hidrográficos Orinoco/Amazonas/Tocantins, rio Magdalena e Paraguai/Uruguai (Fig. 5). As traíras *Hoplias malabaricus* de Alta Floresta e Campo Novo do Parecis, com o fragmento mitocondrial do haplogrupo Paraguai/Uruguai, apresentaram o gene *RAG2* mais relacionado às populações da bacia amazônica e do rio Tocantins. Um espécime coletado em Barra do Bugre, alto rio Paraguai, que possui o gene mitocondrial *ATPase6* do haplogrupo Paraguai/Uruguai, possui o gene nuclear estreitamente relacionado às populações da bacia amazônica. Os espécimes coletados no alto rio Paraguai (Barra do Bugre) que possuem 2n=42A cromossomos apresentaram DNA mitocondrial e nuclear mais relacionado às populações amazônicas.



- | | |
|---|-------------------------------|
| 6 - Pontes e Lacerda - MT, Brasil | 14 - Pau D'arco - PA, Brasil |
| 7 - Campo Novo do Parecis; Sapezal - MT, Brasil | 15 - Novo Aripuanã-AM, Brasil |
| 8 - Sorriso - MT, Brasil | 16 - Juruá - AM, Brasil |
| 9 - Alta Floresta - MT, Brasil | 17 - Tefé - AM, Brasil |
| 10 - Cacoal; Ji-Paraná - RO, Brasil | 18 - Manaus - AM, Brasil |
| 11 - Porto Velho - RO, Brasil | 19 - Santa Maria - AM, Brasil |
| 12 - Aripuanã - AM, Brasil | 20 - Macapá - AP, Brasil |
| 13 - Rio Maria - PA, Brasil | |

Figura I.4 Distribuição dos haplótipos *ATPase6* de *Hoplias malabaricus* no Escudo Cristalino Brasileiro e nas terras baixas da Amazônia.

Em (a) rede de haplótipos com populações da bacia amazônica e do Tocantins presentes no haplogrupo Amazonas/Orinoco. O número de substituições nucleotídicas entre os haplótipos são indicadas pelos números vermelhos (exceto quando foi observada apenas uma substituição); os pontos vermelhos representam os haplótipos não amostrados. Em (b) locais de coleta nas bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Tocantins. As cores correspondem aos haplótipos; a área hachurada ao norte representa o Escudo Cristalino da Guiana e ao sul o Escudo Cristalino Brasileiro.

Tabela I.2 Distância molecular média entre haplótipos *ATPase6* do haplogrupo Amazonas/Orinoco coletados na bacia hidrográfica amazônica e do rio Tocantins

	6	7**	8**	9**	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
6. Pontes e Lacerdae														
7. Campo Novo do Parecis *	0,076													
8. Sorriso	0,075	0,06												
9. Alta Floresta	0,057	0,073	0,061											
10. Cacoal	0,036	0,074	0,059	0,048										
11. Porto Velho	0,035	0,086	0,077	0,056	0,023									
12. Aripuanã	0,033	0,067	0,048	0,054	0,018	0,025								
13. Rio Maria	0,039	0,083	0,068	0,055	0,017	0,021	0,022							
14. Pau D' arco	0,039	0,078	0,063	0,048	0,015	0,026	0,020	0,021						
15. Novo Aripuanã	0,035	0,078	0,071	0,054	0,017	0,018	0,013	0,013	0,02					
16. Juruá	0,043	0,085	0,075	0,052	0,026	0,028	0,029	0,029	0,027	0,027				
17. Tefé	0,056	0,087	0,067	0,058	0,047	0,058	0,053	0,053	0,049	0,049	0,059			
18. Manaus	0,039	0,080	0,067	0,054	0,02	0,024	0,019	0,019	0,016	0,017	0,03	0,049		
19. Santa Maria	0,036	0,076	0,070	0,052	0,021	0,029	0,013	0,023	0,011	0,019	0,032	0,013	0,013	
20. Macapá	0,054	0,084	0,069	0,06	0,045	0,055	0,051	0,051	0,047	0,047	0,057	0,011	0,055	0,048

*Campo Novo dos Parecis e Sapezal, ** A área hachurada indica as localidades com maiores distâncias moleculares das demais localidades.

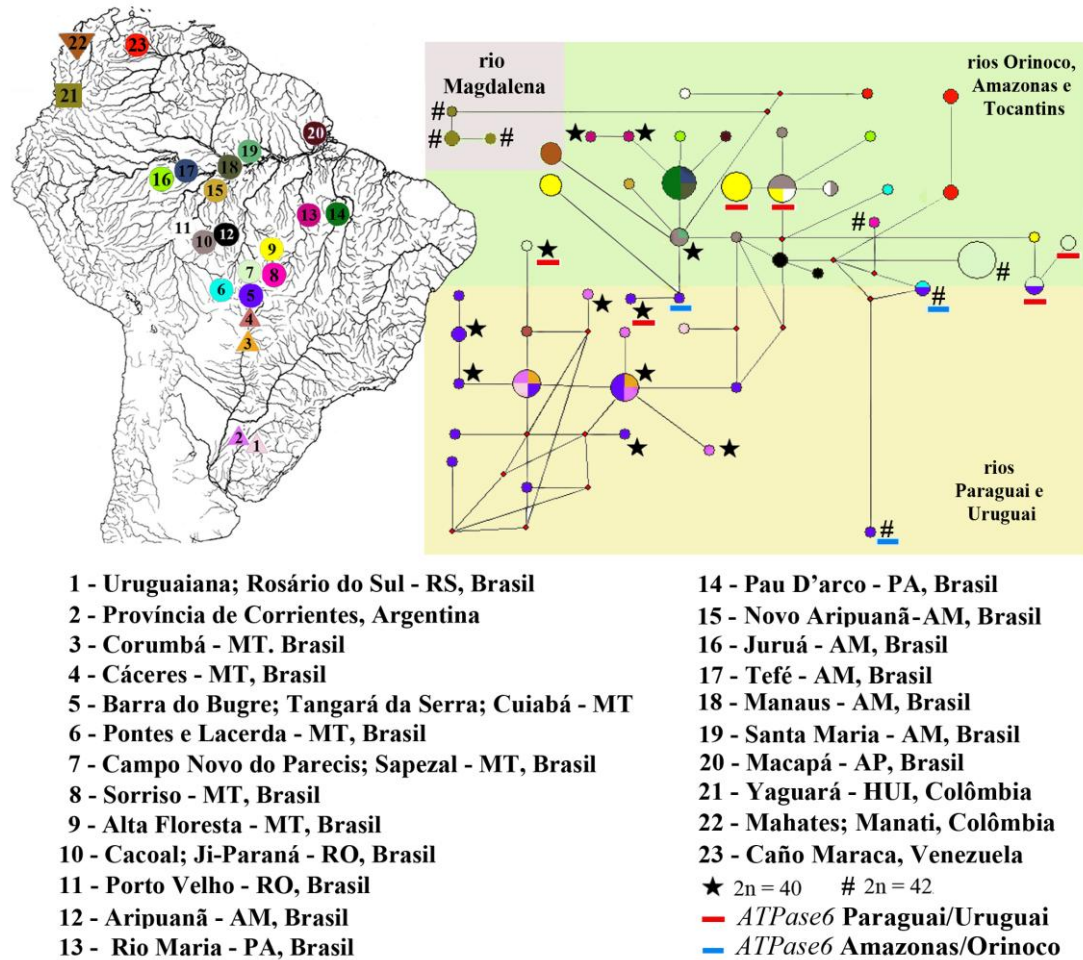


Figura I.5 Rede de haplótipos com o gene *RAG2* em populações de *Hoplias malabaricus*.

As distâncias entre os haplótipos são proporcionais ao número de substituições nucleotídicas. As áreas hachuradas correspondem aos sistemas hidrográficos de coleta. Notar que os haplótipos compartilhados entre as populações da bacia amazônica e do rio Paraguai são restritos aos divisores de águas entre estas bacias. No sistema hidrográfico Paraguai/Uruguai, somente populações do alto Paraguai possuem alelo *RAG2* mais relacionado às populações amazônicas. Nas bacias amazônicas, exclusivamente as populações próximas ao divisor de águas com o alto Paraguai possuem haplótipos mais relacionados às populações Paraguai/Uruguai.

As populações de *Hoplias malabaricus* com número diplóide de 40 e 42 cromossomos não formaram grupos monofiléticos com o gene *ATPase6*. Dentro do haplogrupo Amazonas/Orinoco, três populações apresentaram 2n=40 cromossomos: a população coletada em Santa Maria, no rio Capucapu (JP2787– Jorge Porto *com. pess.*) e os espécimes com cariomorfo 2n=40C coletados em Pau D'arco (bacia hidrográfica do rio Tocantins) e no município de Rio Maria (bacia hidrográfica do rio

Xingu) (Sampaio, 2011). Os haplótipos dos espécimes com $2n=42A$ cromossomos presentes no haplogrupo Amazonas/Orinoco foram coletadas em Barra do Bugre, província de Corrientes, Sapezal e Sorriso (Lima, 2008). Dentro do haplogrupo Paraguai/Uruguai, os espécimes com o cariomorfo $2n=40C$ foram coletados nas bacias hidrográficas dos rios Paraguai (Lima, 2008), Uruguai (Dergam, 1996) e Amazonas (Lima, 2008).

Todos os valores ESS (*Effective Sample Size*) checados em Tracer v.1.5.0 foram maiores que 260 e isto permite assegurar que os parâmetros do modelo de evolução molecular e as estimativas de tempo de divergência entre os haplogrupos são confiáveis, considerando a amostragem desse trabalho. O Fator Bayes $2ln$ para a comparação das hipóteses filogenéticas sem ($ln = -3669,827$) e com o relógio molecular estrito ($ln = -3669,478$), calibrado em 12 Ma a divergência da população do alto rio Magdalena, foi de 0,348 sugerindo que é adequado assumir o relógio estrito. Este relógio molecular indicou um tempo de divergência de 6 Ma entre o haplogrupo Amazons/Orinoco e Paraguai/Uruguai e de 2,6 Ma entre os haplótipos do rio Orinoco e haplótipos amazônicos relacionados (Fig. 6a). O Fator Bayes $2ln$ calculado entre as hipóteses filogenéticas sem ($ln = -3669,827$) e com o relógio molecular estrito ($ln = -3669,997$), calibrado em 12 Ma a divergência das populações do baixo rio Magdalena, foi de 0,17 também sugerindo o uso do relógio estrito. Este relógio molecular indicou uma divergência de 19 Ma entre os haplogrupos Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai, 8 Ma entre os haplótipos do rio Orinoco e aqueles amazônicos mais relacionados e sugere que eventos de dispersão entre as bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Paraguai ocorreram após o início do Plioceno (Fig. 6b).

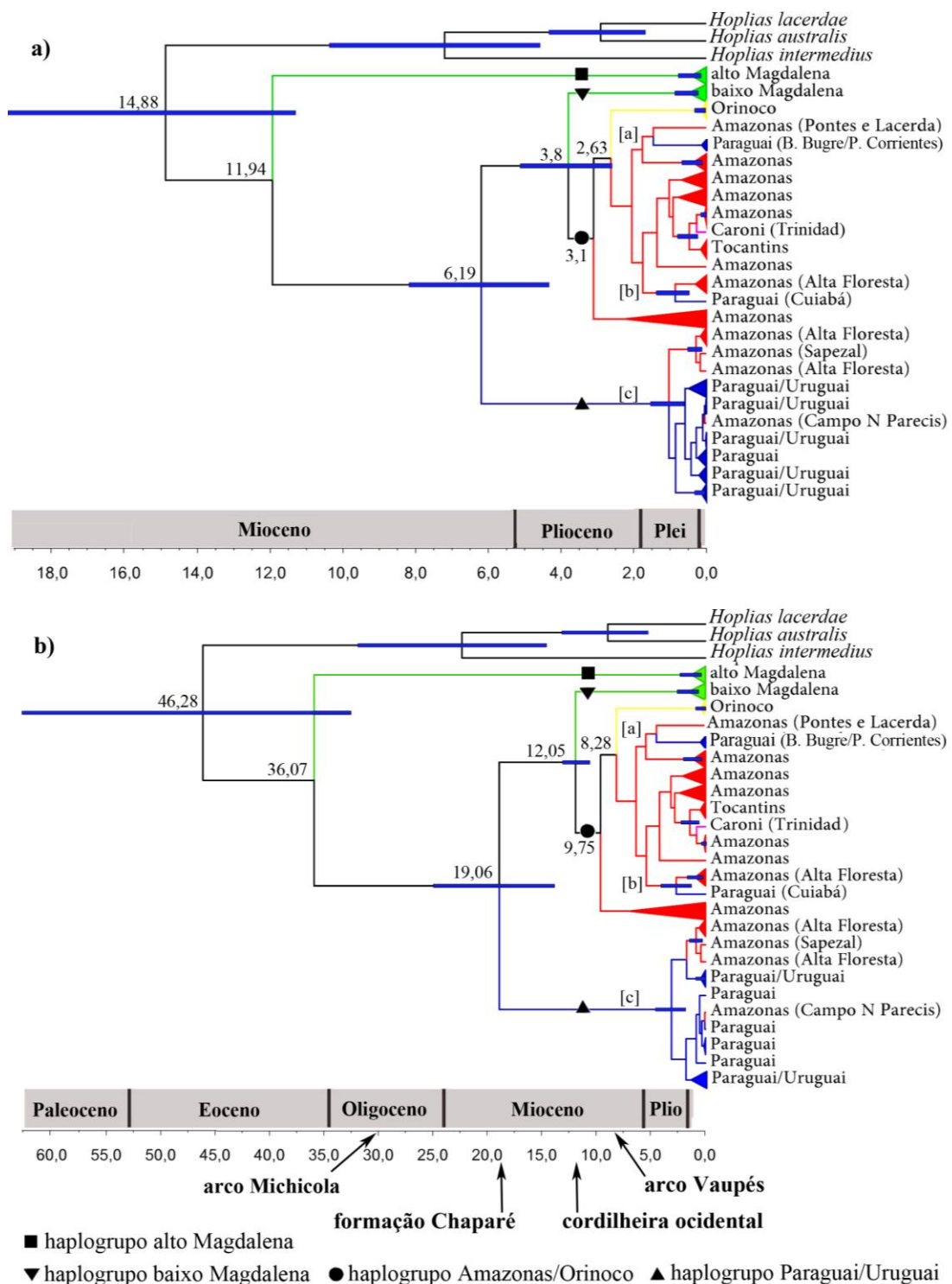


Figura I.6 Hipóteses de tempo de divergência molecular entre os haplogrupos de *Hoplias malabaricus*.

Na primeira estimativa foi calibrado em 12 milhões de anos (Ma), a divergência do haplogrupo alto Magdalena (a). Na segunda estimativa foi calibrado em 12 Ma a divergência do haplogrupo baixo Magdalena (b). Os valores nos nós indicam o tempo de divergência molecular em Ma e as barras azuis o desvio padrão. As setas indicam a idade mínima da formação geológica. Notar que a o tempo de divergência molecular entre os haplogrupos Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai sugeridos pela segunda estimativa são congruentes com o período de capturas de cabeceiras

amazônicas para um paleo-Paraná-Paraguai em decorrência da formação Chaparé (27 - 19 Ma). O tempo de divergência molecular entre as populações do rio Orinoco e amazônicas relacionadas é congruente com o período de formação do arco Vaupés (10 - 8 Ma).

5. DISCUSSÃO

A elevada distância molecular entre o haplogrupo alto Magdalena e as demais populações de *Hoplias malabaricus* pode ser interpretado como decorrente de uma vicariância anterior à formação do vale do rio Magdalena há 13.5 - 11.8 Ma. Novas interpretações no padrão de distribuição de fauna têm demonstrado que bacias hidrográficas não devem ser consideradas homogêneas quanto à ictiofauna, barreiras físicas e ecológicas levam às cabeceiras a apresentarem uma distinta composição das porções mais baixas (eg. Lima & Ribeiro, 2011). Populações de *H. malabaricus* próximas aos divisores de águas têm apresentado elevada distância genética em relação às demais populações da mesma bacia (Santos *et al.*, 2009), como pode ser observado entre o clado formado pelos espécimes coletados em Sorriso, Sapezal e Campo Novo do Parecis e as demais populações do haplogrupo Amazonas/Orinoco (Fig. 1). O relógio molecular, calibrado em 12 Ma para a divergência do haplogrupo baixo Magdalena, apresentou uma hipótese de tempo de divergência congruente com eventos paleohidrológicos reconhecidos como determinantes para a atual configuração das bacias hidrográficas estudadas. Portanto, a segunda estimativa foi assumida na discussão que segue.

A congruência parcial entre a distribuição dos haplótipos de *Hoplias malabaricus* dos haplogrupos Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai com as bacias hidrográficas dos rios Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai pode ser interpretado como reflexo da história paleohidrológica destas drenagens a partir do início do Mioceno. O tempo de divergência molecular de 19 milhões de anos entre as

populações dos sistemas Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai corresponde a um período posterior à maior fase de elevação dos Andes (27 - 19 Ma). O efeito desse processo foi o contato entre o antepaís dos Andes e o Escudo Cristalino Brasileiro, criando a formação Chaparé (Sempere *et al.*, 1990). Aparentemente as Serras Pampeanas, que determinaram os limites entre os sistemas Paraná e Paleo-Amazonas-Orinoco durante o Paleoceno e o arco de Michicola, responsável pelos divisores de águas entre o paleo-Amazonas-Orinoco e paleo-Paraná-Paraguai até o início do Mioceno (Lundberg *et al.*, 1998), não foram os elementos responsáveis pela divergência molecular entre as populações Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai.

A divergência molecular do gene *ATPase6* entre os espécimes de *Hoplias malabaricus* do rio Orinoco e da bacia amazônica (~ 8 Ma) provavelmente é reflexo do soerguimento do arco Vaupés (10 - 8 Ma), o qual separou o antigo sistema Amazonas-Orinoco nas modernas drenagens dos rios Amazonas e Orinoco (Hoorn, 1993; Hoorn *et al.*, 1994). A inesperada similaridade haplotípica da população do rio Caroni com as amostras dos rios Solimões, Capucapu e Araguaia sugere uma história paleohidrológica comum entre a bacia amazônica e a ilha de Trinidad após o Pleistoceno inferior. Atualmente, o rio Casiquiare representa um corredor seletivo entre as águas com pH ácido do rio Negro e pH neutro do rio Orinoco (Winemiller *et al.*, 2008). O rio Orinoco deságua no Delta Amacuro, o qual possui a porção mais ao norte distante aproximadamente 100 km do sul da ilha de Trinidad.

A presença de *Hoplias malabaricus* nas cabeceiras do rio Paraguai e no rio Uruguai com haplótipos pertencentes ao haplogrupo Amazonas/Orinoco pode ser resultado de eventos de dispersão (Fig. 3a e b). Os haplótipos que dispersaram a partir da bacia amazônica foram coletados em simpatria com haplótipos Paraguai/Uruguai, em localidades próximas ao divisor de águas entre as bacias

hidrográficas do Amazonas e Paraguai, exceto aqueles presentes na população da província de Corrientes. Este mesmo padrão de distribuição simpátrica foi observado nos haplótipos Paraguai/Uruguai que foram coletados na drenagem amazônica, indicando que apesar da barreira entre estas duas bacias hidrográficas ser semipermeável a dispersão para as terras baixas amazônicas aparentemente é dificultada. A distribuição restrita dos haplótipos simpátricos na região amazônica provavelmente é favorecida pela condição pouco vágil de *H. malabaricus* e às barreiras físicas ou ecológicas dentro daquela bacia. Uma condição similar é observada em populações 2n=42A dessa espécie que dispersaram do alto rio Grande (alto rio Paraná) para um tributário de cabeceira do rio São Francisco, onde predominam populações com 2n=40F (Santos *et al.*, 2009). A existência de eventos locais de dispersão entre drenagens vizinhas pode levar a uma maior diversidade genética nas porções superiores das drenagens. Eventos recorrentes de capturas de cabeceiras entre tributários amazônicos e o alto rio Paraguai têm sido documentados historicamente, levando a uma maior semelhança de fauna entre estas duas bacias hidrográficas (Pearson, 1937; Alberts *et al.*, 2011). A dispersão restrita às regiões próximas aos divisores de águas aparentemente não é exclusividade de *H. malabaricus*. As porções do rio Paraguai e Amazonas que não envolvem os divisores de águas são reconhecidas regiões de endemismos de peixes (Hubert & Renno, 2006), ou ecorregiões (Abell *et al.*, 2008). Contudo, quando a comparação da ictiofauna é restrita às porções próximas aos divisores de água entre as bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Paraguai é verificada uma elevada similaridade de fauna entre elas (Albert & Carvalho, 2011).

A maior proximidade filogenética entre um haplótipo coletado em Cuiabá com os observados nas populações das cabeceiras do rio Teles Pires sugere dispersão

de *Hoplias malabaricus* desta bacia para as cabeceiras do rio Cuiabá. (Fig. 1 e 3b). Evidências de dispersão de fauna das cabeceiras do rio Teles Pires para a bacia do rio Paraguai são escassas, ao contrário do observado entre o alto rio Juruena e Paraguai. Os rios Juruena e Teles Pires são duas sub-bacias que se unem formando o rio Tapajós, o qual deságua no rio Amazonas. *Batrochoglanis melanurus* (Pseudopimelodidae) é endêmica do rio Paraguai com a espécie irmã *Batrochoglanis villosus* presente na bacia amazônica (Shibatta & Pavanelli, 2005). A provável dispersão de um ancestral a partir de tributários do rio Juruena (rio Arinos) é atribuída à presença de *B. melanurus* na bacia do rio Paraguai. Outras espécies de peixes, como *Moenkhausia cosmops*, estão presentes em tributários do alto rio Juruena e alto rio Paraguai (Lima *et al.*, 2007).

A presença de traíras *Hoplias malabaricus* em Barra do Bugre e na província de Corrientes com o haplótipo *ATPase6* incluído no haplogrupo Amazonas/Orinoco (Fig. 1 e 3a), indica dispersão de populações de *Hoplias malabaricus* da bacia amazônica para o rio Paraguai/Uruguai. No entanto, a ausência de sinal filogenético pelos métodos da parcimônia e bayesiana e o elevado número de substituições nucleotídicas entre os haplótipos relacionados (Fig. 3a) torna difícil estabelecer a partir de qual sub-bacia amazônica ocorreu a dispersão. O rio Guaporé e o alto rio Paraguai possuem divisores de águas com regiões pantanosas e altitudes que raramente excedem 500 metros, oferecendo condições favoráveis à comunicação dos tributários destas drenagens em períodos chuvosos (Reclus, 1895; Barnes & Heins, 2009). Uma condição de comunicação em charcos ou brejos de altitude também é observada na região de dispersão de *H. malabaricus* a partir de tributários do rio Grande para afluentes do alto rio São Francisco (Santos *et al.*, 2009). O rio Guaporé é a sub-bacia amazônica com maior similaridade de ictiofauna com o alto rio

Paraguai. Quarenta e oito espécies estão distribuídas entre estas bacias com maior similaridade de espécies endêmicas entre os rios Paraguai e Guaporé do que com outras sub-bacias do rio da Prata (Albert & Carvalho, 2011), representando um claro reflexo dos recentes eventos de dispersão entre estas drenagens.

A presença de haplótipos do haplogrupo Paraguai/Uruguai nas cabeceiras dos rios Teles Pires e Juruena indica eventos de dispersão do alto Paraguai para a bacia hidrográfica amazônica (Fig. 3c). Evidências de dispersão da ictiofauna do rio Paraguai para a sub-bacia do rio Tapajós (rios Juruena e Teles Pires) são escassas; as dispersões sugeridas para a bacia amazônica envolvem principalmente o alto rio Madeira (Mamoré/Guaporé). *Oligosarcus schindleri* é a única espécie do gênero encontrada na bacia hidrográfica amazônica, com a espécie irmã *Oligosarcus bolivianus* e as outras espécies do gênero distribuída nas cabeceiras do rio Paraguai e bacias costeiras do leste/tributários do rio da Prata, respectivamente. O evento cladogenético proposto para a diversificação de *O. schindleri* e *O. bolivianus* é resultante da orogênese dos Andes durante o Plioceno, que levou à captura de drenagens do alto rio Paraguai para os rios Guaporé e Mamoré (Menezes, 1988). Um padrão de distribuição e diversificação similar é observado no pimelodídeo *Rhamdella*. *Rhamdella rusbyi* é a única espécie do gênero encontrada na região amazônica, enquanto as demais espécies estão distribuídas nas regiões sub-andinas da Bolívia, Argentina e na bacia do rio Paraguai (Bockmann & Miquelarena, 2008). A presença de espécies que possuem ampla distribuição nos sistemas Paraná-Paraguai no rio Guaporé é outro indício de recentes eventos de dispersão entre estas bacias. Este padrão é observado em *Scoloplax empousa* (Schaefer *et al.*, 1990), *Gymnogeophagus balzanii* (Wimberger *et al.*, 1998) e *Brycon hilarii* (Lima, 2003) presentes na bacia do rio Guaporé e distribuídas nos sistemas Paraná-Paraguai.

O reconhecimento do padrão filogeográfico de *Hoplias malabaricus* em escala continental permitiu observar a dispersão bidirecional entre a bacia amazônica e o rio Paraguai. Apesar das dificuldades em descobrir os sentidos das dispersões nessa região de complexa história paleohidrológica (Albert & Carvalho, 2011) a utilização de uma espécie não migratória e de ampla distribuição permitiu recuperar a biogeografia histórica com riqueza de detalhes. Os trabalhos realizados com o objetivo de traçar os padrões filogeográficos da ictiofauna amazônica envolvem aproximadamente 10 táxons (Lovejoy *et al.*, 2010) e demonstram a complexa dinâmica de dispersão e vicariância no final do Neógeno. Poucos trabalhos incluem tempo de divergência e análises biogeográficas de dispersão e vicariância (eg. Hardman & Lundberg, 2006; Hubert *et al.*, 2007a e b), possivelmente devido às dificuldades de estabelecer as regiões que funcionam como fonte e sumidouro.

O tempo de divergência molecular encontrado entre os haplogrupos Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai (19 Ma) sugere que a formação Chaparé foi o evento paleohidrológico responsável pela vicariância das populações de *Hoplias malabaricus* dos sistemas Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai. Por outro lado, a divergência molecular observada entre populações de cascudos do gênero *Hypostomus* da bacia amazônica e do rio Paraguai foi interpretada como resultante de um evento de vicariância de 11,4 - 10,5 Ma (Montoya-Burgos, 2003). Apesar da aparente discordância, estes resultados não são conflitantes, mas reflexo da complexa história paleohidrológica na região. Datações moleculares buscando recuperar eventos de dispersão permitem reconhecer a multiplicidade de eventos de vicariância na região. A diferenciação das espécies irmãs *Prochilodus nigricans* (amazônicos) e *Prochilodus lineatus* (Paraná-Paraguai) é atribuída a capturas de cabeceiras entre tributários da bacia amazônica e do rio Paraguai entre 4,1 - 2,3 Ma (Sivasundar *et al.*,

2001). Eventos de dispersão de populações de *Pygocentrus nattereri* da bacia amazônica para a bacia do Paraná são estimados em $1,77 \pm 0,3$ Ma e em *Serrasalmus marginatus* à $1,76 \pm 0,2$ Ma (Hubert *et al.*, 2007a). Em *H. malabaricus*, são prováveis pelo menos dois eventos de dispersão da bacia amazônica para o alto Paraguai durante o Plioceno e outros dois do alto rio Paraguai para a bacia amazônica após o Plioceno. Portanto, as recorrentes capturas de cabeceira e a presença de charcos com comunicação intermitente entre as bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Paraguai torna frágil qualquer tentativa de estipular um único evento cladogenético para a diversificação de populações e espécies não relacionadas entre estes dois sistemas hidrográficos.

O elevado número de substituições observado no gene *ATPase6* das populações de *Hoplias malabaricus* de Pontes e Lacerda, Campo Novo do Parecis, Sapezal, Sorriso e Alta Floresta (Fig. 4 e Tabela 2) pode ser justificada por barreiras físicas ou ecológicas que isolaram estas populações nas porções altas do Escudo Cristalino Brasileiro, facilitando a fixação de mutações. Grande parte das populações do haplogrupo Amazonas/Orinoco, de baixas altitudes, possuem menor distância molecular com outros haplótipos coletados entre os escudos cristalino da Guiana e Brasileiro. Trechos encachoeirados entre o curso superior e as porções mais baixas dos rios podem ser um impedimento físico ou ecológico ao deslocamento da ictiofauna da parte baixa para a montante do rio. Estas barreiras ao deslocamento podem ter impedido o fluxo gênico entre as populações de *Hoplias malabaricus* presentes nas terras baixas com as populações próximas aos divisores de águas.

Uma hipótese alternativa para explicar a menor distância molecular entre as populações presentes nas porções entre o Escudo Cristalino Brasileiro e da Guiana são efeitos esperados de incursões marinhas nas terras baixas amazônicas.

Inundações marinhas poderiam ter resultado na extinção de populações nas terras baixas, com posterior colonização em períodos de regressões marinhas. Maior diversidade de DNA mitocondrial em populações de *Serrasalmus rhombeus* coletadas na região de Aripuanã foi atribuída a um possível refúgio pleistocênico em períodos de elevação eustática do mar, com posterior colonização das terras baixas do rio Madeira durante as regressões marinhas (Hubert *et al.*, 2007b). No entanto, nenhuma evidência geológica e paleontológica indica grandes incursões marinhas no interior da bacia amazônica nos últimos cinco milhões de anos (Bloom & Lovejoy, 2011). As predições que consideram a influência das incursões marinhas na filogeografia de peixes dulcícolas amazônicos consideram as variações eustáticas históricas no nível do mar nas condições geomorfológicas atuais da região, o que pode levar a interpretações equivocadas da amplitude das áreas inundadas (Bloom & Lovejoy, 2011). De toda forma, se as incursões marinhas nas terras baixas amazônicas fossem as responsáveis pela pequena distância molecular entre os haplótipos *ATPase6* de *H. malabaricus*, nessa região, seria esperado um padrão de expansão na rede de haplótipos a partir das porções altas do escudo cristalino para as terras baixas. Esse padrão não é observado. Considerando estes aspectos, é provável que barreiras físicas e/ou ecológicas entre as porções baixas e as cabeceiras dos tributários da bacia amazônica sejam os elementos responsáveis pela elevada distância molecular entre as populações de *H. malabaricus* de cabeceiras e das terras baixas amazônicas.

As análises filogeográficas baseadas no gene nuclear *RAG2* permitiram verificar a existência de fluxo gênico entre as populações de *Hoplias malabaricus* que dispersam entre o alto Paraguai e a bacia amazônica. Campo Novo do Parecis e Alta Floresta são regiões amazônicas de simpatria de haplótipos *ATPase6* dos

haplogrupos Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai. Nestes dois pontos amostrais, foi possível observar espécimes com padrões de DNA mitocondrial filogeneticamente mais próximos aos haplótipos da bacia hidrográfica do rio Paraguai, enquanto seu DNA nuclear era mais relacionado às outras populações da bacia hidrográfica amazônica (Fig. 5).

A presença de populações de *H. malabaricus* com cariomorfo $2n=40C$ nos haplogrupos *ATPase6* Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai sugere que a atual classificação da macroestrutura cariotípica neste táxon não é adequada para o reconhecimento de grupos monofiléticos. A classificação do cariomorfo $2n=40C$ proposta por Bertollo e colaboradores (2000) é feita com base na presença de $2n=40$ cromossomos meta e submetacêntricos, com ausência de sistemas de cromossomos sexuais. É possível que reduções independentes no número diploide, como sugerido pela topologia gerada com o gene *ATPase6*, levem a cariomorfos com características que os enquadram na classificação $2n=40C$. A condição parafilética de populações com $2n=42A$ também é observada em outras populações de *H. malabaricus* (Bertollo *et al.*, 2000), indicando que a transição entre cariomorfos pode ser um evento recorrente. Lemos e colaboradores (2002) encontraram uma população com o cariomorfo $2n=42B$ no primeiro platô do alto rio Iguaçu, uma região isolada por cachoeiras. Nas porções mais baixas da bacia predominam populações com cariomorfo $2n=42A$ (Vicari *et al.*, 2006). Os autores atribuíram a presença do cariomorfo $2n=42B$ no rio Iguaçu à dispersão de populações entre as bacias costeiras. Porém, as populações de *H. malabaricus* costeiras com cariomorfo $2n=42B$ estão restritas à bacia hidrográfica do rio Doce, com o cariomorfo $2n=42A$ presente nas drenagens costeiras adjacentes (Pereira *et al.*, 2013). A bacia do rio Doce é delimitada a oeste pela cadeia do Espinhaço e ao sul pela Serra da Mantiqueira, duas

importantes barreiras à dispersão da ictiofauna (Ribeiro, 2006; Ingenito & Buckup, 2007). O rio Iguaçu encontra-se no paralelo 25 (latitude sul) e a bacia do rio Doce no paralelo 19 (latitude sul) e *H. malabaricus* possui baixa vagilidade, o que torna pouco parcimoniosa a hipótese de dispersão das populações do rio Doce para o alto rio Iguaçu. Finalmente, ao contrário do observado na população do alto rio Iguaçu, o cariomorfo 2n=42B coletado na porção média da bacia do rio Doce possui sítios ribossomais e blocos heterocromáticos no braço maior do cromossomo X (Born & Bertollo, 2001). Tendo em vista todos estes fatores, é possível que o sistema de cromossomos sexuais das traíras do rio Iguaçu e do rio Doce tiveram origens independentes. O cariomorfo 2n=42B é semelhante ao 2n=42A, diferindo apenas pela presença de um sistema sexual XY com um pequeno cromossomo Y submetacêntrico. O cariomorfo 2n=42A possui ampla distribuição nas bacias hidrográficas da América do Sul e é plesiomórfico em *H. malabaricus* (ver capítulo 2).

Outro processo que poderia explicar a condição parafilética do cariomorfo 2n=40C nas análises com o gene *ATPase6* é o fluxo gênico entre espécimes com o número diploide diferente. Contudo, se a hibridização entre os cariomorfos ocorre, ela deve ser restrita a eventos efêmeros e circunstanciais. Bertollo e colaboradores (2000) indicam ausência de híbridos em populações com cariomorfos simpátricos e em geral a divergência molecular entre cariomorfos é elevada (Santos *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2013).

Os resultados indicam que a evolução e diversificação das populações de *Hoplias malabaricus* das bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Paraguai envolveram dois processos. A formação Chaparé determinou o primeiro evento de vicariância entre as populações Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai, as quais

possivelmente passaram por reduções independentes no número diploide. O segundo processo envolveu dispersões recorrentes e bidirecionais entre as drenagens de cabeceira da bacia amazônica e Paraguai, permitindo o fluxo gênico e criando uma zona simpátrica de haplótipos mitocondriais Amazonas/Orinoco e Paraguai/Uruguai, que aparentemente não se estende às porções mais baixas da bacia amazônica. As relações filogenéticas entre as populações de *H. malabaricus* das bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Paraguai são explicadas pela história paleohidrológica da região, independentemente do número diploide. Portanto, as inferências sobre a evolução dos cariomorfos neste táxon devem ser realizadas com cautela, pois a classificação dos cariomorfos proposta por Bertollo e colaboradores (2000) pode estar baseada em homoplasias e não em homologias.

6. REFERÊNCIAS

- Abell, R., Thieme, M.L., Revenga, C., *et al.*, (2008) Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience*, **58**, 403-414.
- Albert, J.S. & Carvalho, T.P. (2011) Neogene assembly of modern faunas. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp. 119-136. University of California Press, Berkeley, EUA.
- Albert, J.S. Petry, P. & Reis, R.E. (2011) Major biogeographic and phylogenetic patterns. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp. 21-58. University of California Press, Berkeley, EUA.

- Albert, J.S. & Reis, R.E. (2011) Introduction to Neotropical freshwaters. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp.3-19. University of California Press, Berkeley, EUA.
- Barnes, J.B. & Heins, W.A. (2009) Plio-Quaternary sediment budget between thrust belt erosion and foreland deposition in the central Andes, southern Bolivia. *Basin Research*, **21**, 91-109.
- Bertollo, L.A.C., Born, G.G., Dergam, J.A., Fenocchio, A.S. & Moreira-Filho, O. (2000) A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of karyomorphs and cytotoxic considerations. *Chromosome Research*, **8**, 603-613.
- Bertollo, L.A.C., Takahashi, C.S. & Moreira-Filho, O. (1979) Karyotypic studies of two allopatric populations of the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, **2**, 17-37.
- Bloom, D.D. & Lovejoy, N.R. (2011) The biogeography of marine incursions in South America. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp. 137-144. University of California Press, Berkeley, EUA.
- Bockmann, F.A. & Miquelarena, M.A. (2008) Anatomy and phylogenetic relationships of a new catfish species from northeastern Argentina with comments on the phylogenetic relationships of the genus *Rhamdella* Eigenmann and Eigenmann, 1888 (Siluriformes, Heptapteridae). *Zootaxa*, **1780**, 1-54.

- Born, G.G. & Bertollo, L.A.C. (2001) Comparative cytogenetics among allopatric populations of the fish, *Hoplias malabaricus*. Karyomorphs with $2n=42$ chromosomes. *Genetica*, **110**, 1-9.
- Boyce, T.M., Zwick, M.E. & Aquadro, C. F. (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, **123**, 825-836.
- Carvalho, T.P. & Albert, J.S. (2011) The Amazon-Paraguay divide. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp.3-19. University of California Press, Berkeley, EUA.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A. & DeSalle, R. (2005) Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**, 135-153.
- Dergam, J.A (1996) *Phylogeography and character congruence within the Hoplias malabaricus Bloch, 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysii) species complex*. PhD tese. Colorado State University, Colorado, EUA.
- Dergam, J.A., Suzuki, H.I., Shibatta, O.A., Duboc, L.F., Júlio, Jr.H.F., Giuliano-Caetano, L. Black IV, W.C. (1998) Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi, and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology*, **21**, 493-496.
- Doadrio, I., Perea, S., Alcaraza, L. & Hernandez, N. (2009) Molecular phylogeny and biogeography of the Cuban genus *Girardinus* Poey, 1854 and relationships within the tribe Girardinini (Actinopterygii, Poeciliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **50**, 16-30.

- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214-221.
- Eigenmann, C.H. (1906) The freshwater fishes of South and Middle America. *Proceedings of the United States National Museum*, **14**, 1-81.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
- Hardman, M., & Lundberg, J.G. (2006) Molecular phylogeny and a chronology of diversification for “phractocephaline” cat fishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **40**, 410-418.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Hoorn, C. (1993) Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia: Results of a palynostratigraphic study. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, and Palaeoecology*, **105**, 267-309.
- Hoorn, C. (1994) An environmental reconstruction of the palaeo-Amazon river system (Middle to Late Miocene, northwestern Amazonia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, and Palaeoecology*, **112**, 187-238.

- Hoorn, C., Guerrero, J., Lorente, M.A. (1995) Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology*, **23**, 237-240.
- Hubert, N., Duponchelle, F., Nuñez, J., Garcia-Davila, C., Paugy, D. & Renno, J.F. (2007a). Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: Implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, **16**, 2115-2136.
- Hubert, N., Duponchelle, F., Nunez, J., Rivera, R., Bonhomme, R. & Renno, J.F. (2007b) Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. *Molecular Ecology*, **16**, 2488-2503.
- Hubert, N., & Renno, J.F. (2006) Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, **33**, 1414-1436.
- Humboldt, A.V. & Bonpland, A. (1811) *Recueil d'Observations de Zoologie et d'Anatomie Comparée*. F. Schoell Libraire et G. Dufour et Cie, Paris, França.
- Ingenito, L.F.S. & Buckup, P.A. (2007) The Serra da Mantiqueira as a biogeographic barrier for fishes, southeastern Brazil. *Journal of Biogeography*, **34**, 1173-1182.
- Jacobina, U.P., Affonso, P.R.A.M., Carneiro, P.L.S. & Dergam, J.A. (2009) Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **7**, 617-622.

- Jacobina, U.P., Paiva, E. & Dergam, J.A. (2011) Pleistocene karyotypic divergence in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974) (Teleostei: Erythrinidae) populations in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **9**, 325-333.
- Kass, R.E. & Raftery, A.E. (1995) Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association*, **90**, 773-795.
- Lemos, P.M.M., Fenocchio, A.S., Bertollo, L.A.C. & Cestari, M.M. (2002) Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the $2n=42$ group, from the first plateau of the Iguaçu river basin (Paraná State, Brazil). *Caryologia*, **55**, 193-198.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Lima, C.B. (2008) *Variação citogenética em Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) nos limites das bacias alto Paraguai e amazonica*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Brasil.
- Lima, F.C.T. (2003) Subfamily Bryconinae. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes* (ed. por Malabarba L.R., R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena, & C.A.S. Lucena), pp. 174-181. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Lima, F.C.T., Britski, H.A. & Machado, F.A. (2007). A new *Moenkhausia* (Characiformes: Characidae) from central Brazil, with comments on the area relationships between the upper rio Tapajós and upper rio Paraguai systems. *Aqua International Journal of Ichthyology*, **13**, 45-54.
- Lima, F.C.T., Ribeiro, A.C. Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (ed. por

J.S. Albert & R.E. Reis), pp.145-164. University of California Press, Berkeley, EUA.

Lovejoy, N.R., Willis, S.C. & Albert, J.S. (2010) Molecular signatures of Neogene biogeographic events in the Amazon fish fauna. *Amazonia, Landscape and Species Evolution* (ed. por C.M. Hoorn & F.P. Wesselingh), pp. 405-417. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido.

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

Lundberg, J.G., Sabaj Pérez, M.H., Dahdul, W.M., Orangel, A. & Aguilera, S. (2010) The Amazonian Neogene fish fauna. *Neogene History of Western Amazonia and Its Significance for Modern Biodiversity* (ed. por C. Hoorn & F.P. Wesselingh), pp. 281-301. Blackwell, London, Reino Unido.

Menezes, N.A. (1988) Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei, Characidae) from Central and Southern South America. *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (ed. por P.E. Vanzolini & W.R. Heyer), pp. 295-304. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Brasil.

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

- Nylander, J.A.A. (2004) *MrModeltest* v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden. Available at <http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>.
- Olson, D., Dinerstein, E., Canevari, P., *et al.*, (1998). *Freshwater biodiversity of Latin America and the Caribbean: a conservation assessment*. Biodiversity Support Program, Washington DC, EUA.
- Oyakawa, O.T. (2003) Family Erythrinidae. *Check list of the freshwater fishes of South America* (ed. por R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr), pp. 238-240. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Pearson, N.E. (1937) The fishes of the Beni-Mamoré and Paraguay basin, and a discussion of the origin of the Paraguayan fauna. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, **23**, 99-114.
- Pereira, T.L., Santos, U., Schaefer, C.E., Souza, G.O., Paiva, S.R., Malabarba, L.R., Schmidt, E.E., Dergam J.A. (2013). Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *Journal of Biogeography*, **40**, 905-914.
- Quenouille, B., Bermingham, E. & Planes, S. (2004) Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **31**, 66-88.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2009) *Tracer* v1.5.0 <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.

- Reclus, E. & Keane, A.H. (1895) *The earth and its inhabitants: Amazonia and La Plata*. Appleton and Company, New York, EUA.
- Reis, R.E. (1998) Systematics, biogeography, and the fossil record of the Callichthyidae: A review of the available data. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes* (ed. por L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena, & C.A.S. Lucena), pp. 351-362. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Reis, R.E., S.O. Kullander, & Ferraris Jr., C.J. (2003) *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Ribeiro, A.C. (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, **4**, 225-246.
- Sampaio, W.M.S. (2011) *Estudos citogenéticos em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) na região da Serra dos Carajás, nas bacias hidrográficas do Tocantins-Araguaia e do Xingu*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Santos, U., Völcker, C.M., Belei, F.A., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Paiva, S.R. & Dergam, J.A. (2009) Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, **75**, 2326-2343.

- Sempere, T., Herail G., Oller, J., & Bohnomme, M. (1990) Late Oligocene-Early Miocene major tectonic crisis and related basin in Bolivia. *Geology*, **18**, 946-949.
- Schaefer, S.A. (1990) Anatomy and relationships of the scoloplacid catfishes. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **142**, 167-210.
- Shibatta, O.A., & Pavanelli, C.S. (2005) Description of a new *Batrochoglanis* species (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from the rio Paraguai basin, State of Mato Grosso, Brazil. *Zootaxa*, **1092**, 21-30.
- Sivasundar, A., Bermingham, E., & Orti, G. (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes *Prochilodus* (Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, **10**, 407-417.
- Smith, W.L., Chakrabarty, P. & Sparks, J.S. (2008) Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics*, **24**, 1-17.
- Sullivan, J.P., Lundberg, J.G. & Hardman, M. (2006) A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 636-662.
- Swofford, D.L. (2002) *PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, EUA.
- Tamura, K.P.D., Peterson, N.S.G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

- distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.
- Vari, R.P. & Malabarba, L.R. (1998) Neotropical ichthyology: An overview. *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes* (ed. por L.R. Malabarba, R. E. Reis, R. Vari, Z.M.S. Lucena, & C.A.S. Lucena), pp. 1-11. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Vicari, M.R., Pazza, R., Artoni, R.F., Margarido, V.P. & Bertollo, L.A.C. (2006) Cytogenetics and Biogeography: Considerations about the Natural Origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçu River. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **49**, 297-303.
- Wesselingh, F.P. & Hoorn, C. (2011) Geological Development of Amazon and Orinoco Basins. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp. 59-67. University of California Press, Berkeley, EUA.
- Wilcox, T.P., Zwickl, D.J., Heath, T.A. & Hillis, D.M. (2002) Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**, 361-371.
- Wimberger, P.H., Reis, R.E., & Thornton, K.R. (1998) Mitochondrial phylogenetics, biogeography, and evolution of parental care and mating systems in *Gymnogeophagus* (Perciformes: Cichlidae). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes* (ed. por L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, C.A.S. Lucena, & Z.M.S. Lucena), pp. 509-518. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.

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

**II. CAPÍTULO 2: BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA DOS CARIOMORFOS
DE *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) NAS
BACIAS HIDROGRÁFICAS DA AMÉRICA DO SUL**

1. RESUMO

Objetivo Testar a hipótese que a evolução e diversificação das populações de *Hoplias malabaricus* das bacias hidrográficas da América do Sul foram direcionadas por eventos geomorfológicos e paleoclimáticos que determinaram os padrões de distribuição da ictiofauna neotropical.

Localização Tributários dos rios Magdalena e Orinoco; rio Caroni (ilha de Trinidad); tributários das sub-bacias amazônicas: Solimões, Madeira, Guaporé, Tapajós, Xingu; rio Araguaia (afluente do Tocantins), rio Parnaíba; calha e tributários dos rios São Francisco, Paraná, Paraguai e Uruguai; bacias costeiras do sul, sudeste, leste e nordeste do Brasil.

Métodos Duzentos e oitenta e três espécimes foram analisados. As análises de inferência bayesiana e máxima parcimônia foram realizadas com base na variação do gene mitocondrial ATP sintase 6 (*ATPase6*), utilizando o modelo de evolução molecular mais adequado obtido com MrModeltest. As redes de haplótipos com os genes *ATPase6* e gene nuclear ativador de recombinação 2 (*RAG2*) foram construídas utilizando o software Network 4.6.1.1. A estimativa de tempo de divergência entre os haplogrupos foi realizada utilizando as sequências do gene *ATPase6* no software BEAST 1.5.1.

Resultados O padrão de variação do gene *ATPase6* indicou cinco haplogrupos, sendo os dois mais diferenciados restritos ao norte da Cordilheira dos Andes (alto Magdalena) e à porção central do Escudo Cristalino Brasileiro. Os três haplogrupos restantes distribuíram-se principalmente: (1) em praticamente todas as bacias hidrográficas da América do Sul ao leste dos Andes, exceto nas costeiras atlânticas ao sul da formação Abrolhos, (2) nas bacias do sistema hidrográfico Paraná/rio da

Prata e (3) nas drenagens do Paraná/rio da Prata e costeiras atlânticas ao sul da Formação Abrolhos. O padrão de variação do gene *RAG2* indicou uma topologia parcialmente congruente com aquela obtida com mtDNA e totalmente congruente com os dados cariotípicos, resultando em três agrupamentos principais: (1) populações com $2n=42$ cromossomos amazônicas, (2) populações com $2n=42$ cromossomos do alto Magdalena, bacias costeiras atlânticas e do rio Paraná/rio da Prata e (3) populações com $2n=40$ cromossomos. Dentro deste último grupo, alguns espécimes coletados em drenagens de cabeceira apresentaram um mosaico de marcadores nucleares e mitocondriais, sugerindo fluxo gênico entre populações com $2n=40$ de bacias hidrográficas contíguas.

Principais conclusões O norte/noroeste da América do Sul é o centro de origem de *Hoplias malabaricus* e a partir do Mioceno este táxon aumentou sua distribuição para o sul do continente. Nesta época, a redução do número diploide de 42 para 40 cromossomos já estava estabelecida. A partir do Plioceno, a formação do cânion e salto de Sete Quedas levou ao isolamento das populações com o cariomorfo $2n=40C$ do baixo rio Paraná daquelas da porção alta da bacia, onde se estabeleceu o cariomorfo $2n=39/40D$. Na bacia hidrográfica amazônica, a topologia indicada pelo gene *ATPase6* sugere dois cenários alternativos: uma segunda redução no número diploide em *H. malabaricus* de $2n=42$ para $2n=40$ cromossomos durante o Plioceno inferior, ou ocorreu fluxo gênico entre espécimes com o número diploide diferente. A partir do Plioceno, as populações de *H. malabaricus* com o cariomorfo $2n=40F$ se estabeleceram nas bacias hidrográficas dos rios São Francisco, Parnaíba e costeiros do nordeste. Durante o Pleistoceno, a formação de paleo-canais com água doce, na linha da costa oriental do continente, provavelmente permitiu o fluxo gênico entre populações de *H. malabaricus* que hoje estão isoladas nas bacias costeiras.

2. INTRODUÇÃO

Até 2012 foram reconhecidas 5400 espécies de peixes água doce neotropicais (Reis, 2013) e estima-se existirem 2600 a serem descritas (Schaefer, 1998). Em escala global, a ictiofauna dulcícola neotropical representa pelo menos 10 % de todas as espécies de vertebrados (Vari & Malabarba, 1998) ocupando menos de 0,003% de toda a água doce disponível no mundo (revisado em Vari & Malabarba, 1998). A América do Sul abriga mais de 4000 espécies de peixes dulcícolas, sendo o continente com a maior riqueza destes vertebrados no planeta (Reis, 2013), provavelmente devido à longa história evolutiva envolvendo vicariâncias e especializações dos peixes Otophysi. A bacia hidrográfica do rio Amazonas possui a maior riqueza de peixes listada para um sistema hidrográfico no mundo com 2.173 espécies conhecidas (Albert *et al.*, 2011). As proporções continentais e consequente heterogeneidade em estrutura de habitat (altitude, gradiente de correnteza, regime de chuvas, temperatura, floresta de cobertura e tipo de solos) são os principais fatores que permitem o abrigo dessa rica ictiofauna (Olson *et al.*, 1998).

Para compreender quais os processos responsáveis pela espetacular diversificação da ictiofauna neotropical é preciso uma análise integrativa considerando diversas áreas das ciências naturais e uma abordagem envolvendo não somente a bacia amazônica, mas as demais bacias hidrográficas do continente. Essa capacidade foi aumentada nas últimas décadas, graças à maior disponibilidade de informações paleoclimáticas, geomorfológicas e filogenéticas em diversos táxons (eg. Lundberg, 1998; Albert & Reis, 2011). Aparentemente, o contexto de diversificação de grande parte dessa rica ictiofauna ocorreu há dezenas de milhões de anos, quando grande parte dos sistemas hidrográficos que hoje estão isolados estava interligada (Weitzman & Weitzman 1988; Lundberg, 1998; Albert & Reis, 2011).

Isto explica o porquê de muitas espécies e gêneros de peixes amazônicos estarem presentes em outras bacias hidrográficas da América do Sul (Albert & Reis, 2011).

Os estudos dos padrões de distribuição geográfica de peixes na região neotropical foram inicialmente baseados em caracteres morfológicos (Ihering, 1891; Eigenmann, 1909; Haseman, 1912) e recentemente abordagens moleculares e citogenéticas foram incorporadas a estas análises (Hubert *et al.*, 2007; Willis *et al.*, 2010; Albert & Reis, 2011; Pereira *et al.*, 2013). Os peixes obrigatoriamente dulcícolas são excelentes modelos para estudos biogeográficos, pois são restritos ao ambiente de água doce, permitindo estabelecer um nexo causal entre seus padrões de distribuição e eventos paleohidrológicos como conexão de bacias hidrográficas, incursões marinhas no continente, isolamentos de drenagens e capturas de cabeceiras (Myers, 1938). Linhagens genealógicas relacionadas de peixes de água doce, presentes em bacias hidrográficas hoje isoladas, indicam que estes sistemas hidrográficos tiveram continuidade física no passado. Estes padrões de distribuição de táxons monofiléticos podem ser corroborados com a existência de padrões coincidentes de organismos aquáticos não-relacionados, regiões de endemismos de espécies de peixes e, em alguns casos, com a distribuição de organismos terrestres. A concordância destes padrões é geralmente explicada pela história paleohidrográfica comum à região (Nelson & Platnick, 1981).

No Cretáceo, durante a ruptura da Gondwana, grande parte das bacias hidrográficas presentes no território correspondente à América do sul drenava para o oeste. Posteriormente, com a abertura do oceano Atlântico e com as pressões de compressão leste-oeste, que levaram ao soerguimento dos Andes, ocorreu uma complexa dinâmica de mudança no curso dos rios o que permitiu que hoje 93% das drenagens do continente deságuem no Oceano Atlântico (eg. Lundberg, 1998).

Nos primeiros 88 milhões de anos (Ma) de independente história paleohidrográfica entre a América do Sul e a África, a região correspondente a atual bacia amazônica, drenava principalmente para o oeste no *rift* entre o escudo cristalino da Guiana e Brasileiro (Wesselingh & Hoorn, 2011). A pressão tectônica e elevada carga sedimentar dos Andes, para o interior do continente, levou a formação da subsidência da bacia de antepaís e a formação de grandes sistemas de drenagens paralelos aos Andes durante o final do Cretáceo (Lundberg *et al.*, 1998). Nessa época, o paleo-Amazonas-Orinoco com cabeceiras na Argentina e no Chile também drenava a região correspondente ao norte do rio Magdalena em direção ao Caribe (Cretáceo - início do Cenozóico). Posteriormente, uma divisão leste-oeste da bacia iniciou no Oligoceno em decorrência do soerguimento do arco Purús, ligeiramente a oeste da cidade de Manaus (Lundberg, 1998). O Neógeno também foi um período de grande atividade tectônica e de depósitos de sedimentos oriundo dos Andes, os quais levaram a complexas mudanças no curso das drenagens na região das modernas bacias dos rios Orinoco, Amazonas e Paraguai (Wesselingh & Hoorn, 2011). Pulsos de soerguimento da cordilheira oriental dos Andes a 13,5 - 11,8 Ma, antes do presente, levaram à separação da bacia hidrográfica do rio Magdalena do paleo-Amazonas-Orinoco (Hoorn *et al.*, 1995). No período de 11 - 7 Ma, com o fechamento do portal caribenho em decorrência da elevação continuada da cordilheira oriental da Colômbia, da elevada quantidade de sedimentos oriundos dos Andes e da formação de arcos estruturais, ocorreu o estabelecimento das modernas drenagens dos rios Orinoco e Amazonas (Hoorn *et al.*, 1994; Lundberg *et al.*, 1998).

A história paleohidrológica entre as bacias dos rios Paraguai e Amazonas está relacionada a complexos eventos de capturas de cabeceira entre as cabeceiras do paleo-Amazonas-Orinoco e de um paleo-Paraná-Paraguai. No período de 43-30 Ma,

o soerguimento do arco Michicola determinou que as Serras Pampeanas perdessem sua relevância como divisores de água entre as cabeceiras do paleo-Paraná-Paraguai e as drenagens do paleo-Amazonas-Orinoco (Lundberg *et al.*, 1998). Posteriormente, pulsos de soerguimento na porção central dos Andes levaram ao encontro da cordilheira com o Escudo Cristalino Brasileiro (formação Chaparé – 27 a 19 Ma.) e consequente captura de cabeceiras amazônicas pelo paleo-Paraná-Paraguai (Sempere, *et al.*, 1990). Em seguida, a elevada carga de sedimentos dos Andes e as capturas de cabeceiras de um paleo-rio-Paraguai para as drenagens amazônicas levaram ao deslocamento para o sul dos limites entre estas drenagens de 11.8 a 10 Ma (Lundberg *et al.*, 1998). Hoje, os divisores de águas entre o alto Paraguai e as drenagens amazônicas encontram-se localizados na região correspondente ao arco Michicola (Lundberg *et al.*, 1998). Capturas de cabeceiras de afluentes do alto Paraná para o rio Paraguai também são indicadas, as quais somadas à elevada carga sedimentar dos Andes contribuíram com a formação do Pantanal mato-grossense (Uba *et al.*, 2006). Concomitantemente a estas complexas alterações geológicas, mudanças eustáticas no nível do mar determinaram uma dinâmica de incursões marinhas nas regiões de baixa altitude das modernas bacias dos rios Orinoco, Amazonas, Paraguai e Paraná (Bloom & Lovejoy, 2011).

Ao contrário das bacias hidrográficas dos rios Orinoco, Amazonas, Paraguai e do baixo rio Paraná, onde grande parte da drenagem raramente excede 250 metros acima do nível do mar, os tributários do rio São Francisco e do alto rio Paraná possuem a maior parte do percurso em áreas superiores a esta altitude (Bloom & Lovejoy, 2011). Contudo, as pequenas inclinações no relevo destes sistemas hidrográficos (Buckup, 2011) são semelhantes ao observado nas porções baixas da região amazônica e do rio Paraguai. Evidências geomorfológicas permitem inferir

que grande parte das áreas correspondentes ao alto rio Paraná e São Francisco já estavam estabelecidas desde o período da quebra da Gondwana (Lima & Ribeiro, 2011). Estas bacias possuem história paleohidrológica estreitamente relacionada com as bacias costeiras devido à complexa atividade tectônica desde o início do Terciário associada ao sistema de falhas existentes na região (Ab'Saber, 1998).

Nas bacias costeiras do leste do Brasil, as alterações eustáticas no nível do mar e as dinâmicas geomorfológicas locais, aparentemente, foram os principais eventos responsáveis pelo padrão biogeográfico da ictiofauna. As bacias costeiras do Brasil são tradicionalmente consideradas como unidades de endemismo, devido ao elevado número de gêneros e espécies endêmicas com alguns táxons restritos a pequenos grupos de drenagens ou a uma única bacia (Vari, 1988; Weitzman *et al.*, 1988; Bizerril, 1994; Buckup, 2011). A presença de espécies de peixes relacionadas, ou das mesmas espécies, em bacias hidrográficas hoje isoladas, tem sido atribuída a comunicações destas drenagens na foz, em períodos de máxima glacial (Weitzman *et al.*, 1988; Beheregaray *et al.*, 2002). Os principais sistemas de drenagem costeiros do leste se formaram no Cretáceo e a presença das mesmas espécies de peixes em bacias continentais e drenagens costeiras é interpretado como decorrente de recentes capturas de cabeceiras, o chamado “padrão C” de Ribeiro (2006). Outros dois padrões de distribuição propostos são associados com eventos cladogenéticos do Terciário que levaram a observação de gêneros irmãos em bacias costeiras e continentais (“padrão B”) e a eventos cladogenéticos do Cretáceo que levaram a condição de famílias ou sub-famílias irmãs presentes em drenagens costeiras e continentais (“padrão A”) (Ribeiro, 2006).

Estudos filogeográficos baseados em dados moleculares e citogenéticos de *Hoplias malabaricus* na região oriental do Brasil têm demonstrado a importância da

dinâmica glacial e das capturas de cabeceiras nas genealogias, as quais são congruentes com regiões de endemismos de peixes (Pereira *et al.*, 2013). *Hoplias malabaricus* é um dos Characiformes neotropicais com maior distribuição, ocorrendo em toda região ao leste dos Andes, da Costa Rica até a Argentina (Oyakawa, 2003). Esta espécie é bem adaptada a viver em populações pequenas e isoladas, condições que facilitam a fixação de rearranjos cromossômicos (revisado em Sites & Moritz, 1987), os quais também podem ser informativos na formulação de hipóteses filogeográficas (Santos *et al.*, 2009). *Hoplias malabaricus* é um dos táxons de peixes mais estudado citogeneticamente, com sete cariomorfos, números diploides variando de 39 a 42 cromossomos (Bertollo *et al.*, 2000) e é organismo modelo em muitos estudos biológicos (e.g. Corrêa *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2013).

O padrão de distribuição dos cariomorfos de *Hoplias malabaricus* nas bacias hidrográficas da América do Sul permite o reconhecimento de três grupos de acordo com a área de ocorrência. O grupo com ampla distribuição (1) composto pelos cariomorfos $2n=42A$ e $2n=40C$, encontrados em simpatria nas bacias hidrográficas dos sistemas Paraná-Paraguai e do rio Amazonas. O grupo (2) que apresenta distribuição intermediária, formado por três cariomorfos: $2n=40F$ que ocorre na bacia hidrográfica do rio São Francisco, nas bacias costeiras do Suriname ao nordeste do Brasil e nas porções baixas do rio Tocantins; no mesmo grupo, o cariomorfo $2n=39/40$ encontrado no alto rio Paraná (em simpatria com $2n=42A$) e o cariomorfo $2n=40/41G$ distribuído na bacia amazônica, nos rios Aripuanã, Madeira e Trombetas. O ultimo grupo (3) é formado por cariomorfos com distribuição restrita e inclui as traíras $2n=42B$ que ocorrem na bacia do rio Doce (em simpatria com $2n=42A$) e traíras $2n=42E$, restritas ao rio Trombetas (Bertollo *et al.*, 2000).

O objetivo deste estudo foi realizar análises filogeográficas das populações de *Hoplias malabaricus* coletadas nas principais drenagens da América do Sul, e determinar se existe cenário paleohidrológico consistente com as genealogias obtidas e com o tempo correlacionado com a divergência molecular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As traíras *Hoplias malabaricus* foram coletadas nas bacias hidrográficas dos rios: Magdalena, Orinoco, Caroni (ilha de Trinidad), Amazonas, Tocantins, Parnaíba, São Francisco, Paraná, Paraguai, Uruguai e bacias costeiras do nordeste, leste e sudeste e sul do Brasil (Tabela 1). *Hoplias australis*, *Hoplias intermedius* e *Hoplias lacerdae* foram utilizadas como grupo externo. As amostras de tecidos utilizadas neste estudo estão depositadas no Laboratório de Sistemática Molecular Beagle da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os vouchers foram depositados no Museu de Zoologia João Moojen na Universidade Federal de Viçosa. A permissão de coleta no Brasil (SISBIO14975-1) foi fornecida ao professor Jorge A. Dergam pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio).

Tabela II.1 Amostras de tecidos de *Hoplias malabaricus* depositadas no Laboratório de Sistemática Molecular Beagle (UFV) utilizadas, coordenadas geográficas e locais de coleta

Bacia hidrográfica	Identificação da amostra	Coordenadas GPS	Local
Uruguai	JD3871	S 33° 15' 51'' W 56° 24' 07''	Arroyo Tejeras, Durazno, Uruguai.
Uruguai	AN1; AN2; AN3; AN4; AN5; AN6; AN7	S31° 44' 21'' W 55° 58' 04''	Estância Experimental La Magnolia INIA, Tacuarembó, Uruguai.
Uruguai	9508	S 30° 14' 10'' W 54° 55' 00''	Rio Santa Maria, Rosário do Sul – RS, Brasil.
Uruguai	9503	S 29° 44' 20'' W 57° 05' 21''	Rio Uruguai, Uruguiana – RS, Brasil.
Uruguai	AL02; AL03; AL21; AL24; AL25; AL27; AL 28; AL31; AL37; AL40; AL44; AL45; AL48; AL50; AL53; AL54; AL55; AL56; AL63; AL65	S 29° 04' 54'' W 56° 36' 14''	Rio Aguapey, Provincia de Corrientes, Argentina.
Uruguai	MPB111	S 27° 37' 25'' W 51° 08' 47''	Rio Canoas, Anita Garibaldi – SC, Brasil.
Uruguai	208	S 27° 31' 11'' W 51° 40' 01''	Represa de Machadinho, Machadinho – SC, Brasil.
Tramandai	LQ231	S 29° 43' 42'' W 50° 08' 49''	Lagoa dos Quadros, Capão da Canoa – RS, Brasil.
Perequê	OH03	S 25° 22' 50'' W 48° 27' 01''	Rio Perequê, Paranaguá – PR, Brasil.
Ribeira de Iguape	IG03	S 24° 29' 11'' W 47° 50' 30''	Rio Ribeira, Registro – SP, Brasil.
Ilha do Cardoso	AD09	S 23° 10' 13'' W 47° 58' 49''	Ilha do Cardoso – SP, Brasil.
Macacu	MN04	S 22° 25' 17'' W 42° 37' 40''	Cachoeiras de Macacu – RJ, Brasil.
Macaé	JD3876	S 22° 29' 35' W 42° 13' 35'	Rio Macaé, Casimiro de Abreu – RJ, Brasil.
São João	CT691	S 22° 40' 54" W 42° 22' 19"	Rio D'Ouro, Silva Jardim – RJ, Brasil.
Paraíba do Sul	3681	S 22° 44' 58'' W 44° 07' 43''	Rio Pirai, Rio Claro – RJ, Brasil.
Paraíba do sul	CT666	S 21° 29' 79'' W 42° 31' 45''	Leopoldina – MG, Brasil.
Paraíba do Sul	JD1225	S 21° 04' 88'' W 42° 20' 53''	Rio Muriaé, Muriaé – MG, Brasil.
Itabapoana	CT614; CT617	S 21° 08' 09'' W 41° 39' 31''	Rio Itabapoana, Bom Jesus do Itabapoana – RJ, Brasil.
Doce	1907	S 19° 51' 32'' W 43° 7' 11''	UHE Piracicaba, Rio Piracicaba – MG, Brasil.
Doce	PF12	S 19° 46' 32'' W 42° 35' 22''	Lagoa Dom Helvecio, Marliéria – MG, Brasil.
Doce	PF28; PF33	S 19° 45' 30'' W 42° 37' 02''	Lagoa Carioca, Marliéria – MG, Brasil.
São Mateus	JD506	S 18° 45' 31'' W 40° 38' 17''	Rio Muniz, ES, Brasil.
São Mateus	JD465	S 18° 44' 21'' W 40° 53' 29''	Rio São Mateus, Barra São Francisco – ES, Brasil.

Tabela II.1 Continuação

Bacia hidrográfica	Identificação da amostra	Coordenadas GPS	Local
São Mateus	JD550; JD546	S 18° 43' 43'' W 39° 46' 33''	Preto River, Guiriri – ES, Brasil.
Mucuri	JD637	S 17° 02' 12'' W 40° 57' 49''	Córrego Águas Quentes, Águas Formosas – MG, Brasil.
Itanhém	JR01	S 17° 32' 07'' W 39° 13' 52''	Rio Alcobaça, Caravelas – BA, Brasil.
Itanhém	JD654	S 17° 04' 30'' W 40° 47' 55''	Rio Itanhém, entre Águas Formosas e Machacalis – MG, Brasil.
Jucuruçu	JD675	S 16° 36' 21'' W 40° 28' 04''	Rio Jucuruçu, Palmópolis – MG, Brasil.
Jequitinhonha	AA101	S 16° 56' 33'' W 42° 00' 49''	Rio Calhauzinho, Araçuaí, – MG, Brasil.
Jequitinhonha	EE01; EE02	S 16° 50' 58'' W 41° 47' 07''	Rio Araçuaí, Araçuaí – MG, Brasil.
Jequitinhonha	MT01	S 16° 34' 06'' W 41° 28' 00''	Rio Jequitinhonha, Itaobim – MG, Brasil.
Buranhém	JD698; JD701	S 16° 24' 48'' W 39° 35' 13''	Buranhém River, Eunápolis – BA, Brasil.
Contas	PC03; PC08	S 13° 52' 22'' W 40° 03' 39''	Das Contas River, Jequié – BA, Brasil.
Paraguaçu	EE67	S 12° 34' 56'' W 39° 00' 00''	Represa Pedra do Cavalo, Gov. Mangabeira – BA, Brasil.
Itapicuru	UPG01	S 13° 14' 40'' W 41° 23' 34''	Jacobina – BA, Brasil.
Paraná	1; 12; 17	S 32° 11' 00'' W 64° 18' 00''	Rio Catalamochita, Almafuerde, Provincia de Córdoba, Argentina.
Paraná	T1; T2; T3; T4; T5; T6; T10; T11; T12	S 23° 33' 25'' W 45° 50' 38''	Rio Tietê, Salesópolis – SP, Brasil.
Paraná	AH1; AH2; AH6; AH7; AH8; AH9; AH10; AH11;	S 23° 33' 25'' W 45° 50' 38''	Rio Tietê, Salesópolis – SP, Brasil.
Paraná	AH12; AH13; AH14; AH15; AH16	S 23° 33' 25'' W 45° 50' 38''	Rio Tietê, Salesópolis – SP, Brasil.
Paraná	898; 899	S 22° 28' 44'' W 47° 35' 31''	Rio Claro – SP, Brasil.
Paraná	7; 23	S 23° 02' 45'' W 50° 59' 38''	Rio Tibagi, Sertanópolis – PR, Brasil.
Paraná	IR1; IR3; IR4; IR5; IR6	S 22° 34' 73'' W 47° 30' 29''	Iracemópolis – SP, Brasil.
Paraná	MO3; MO4; MO5	S 21° 59' 10'' W 47° 52' 46''	Córrego Monjolinho, São Carlos – SP, Brasil.
Paraná	US19; US20; US23; US24; US25; US27; US28; US30; US31	S 20° 48' 29'' W 44° 33' 58''	Rio Jacaré, Oliveira – MG, Brasil.
Paraná	MG02	S 21° 36' 20'' W 47° 47' 49''	Lagoa Porto Velho, Ribeirão Preto – SP, Brasil.
Paraná	VG34; VG36	S 20° 1' 11'' W 48° 11' 55''	Rio Grande, Conceição das Alagoas – MG, Brasil.
Paraná	C22; C26; C30	S 17° 42' 41'' W 48° 29' 21''	Rio Corumbá, Corumbá de Goiás – GO, Brasil.

Tabela II.1 Continuação

Bacia hidrográfica	Identificação da amostra	Coordenadas GPS	Local
Paraná	HM52; HM829; HM2cor; HM8cor; HM05; HMCOR1; HM823	S 18° 32' 13'' W 50° 02' 41''	Quirinópolis – GO, Brasil.
Paraná	OHM7	S 18° 46' 00'' W 50° 29' 28''	Rio Alegre, São Simão ou Quirinópolis – GO, Brasil.
São Francisco	US22; US29; US37; US38; US39	S 20° 08' 21'' W 44° 53' 17''	Córrego Tombadouro, Passa Tempo – MG, Brasil.
São Francisco	US01; US02; US03; US04; US05; US06; US07; US08; US09; US10; US11; US12; US14	S 20° 08' 21'' W 44° 53' 17''	Rio Pará, Divinópolis – MG, Brasil.
São Francisco	SA3; SA4; SA9; SA20; SA25; SA29; SA35; SA56	S 18° 42' 57'' W 44° 25' 56''	Rio Das Velhas, Curvelo – MG, Brasil.
São Francisco	US142; US144; US145; US146; US148; US150	S 15° 40' 35'' W 44° 36' 54''	Pantano Pandeiros, Januária – MG, Brasil.
São Francisco Paraguai	CAR12; CAR25; JD2954; JD3004	S 8° 30' 31'' W 37° 42' 21''	Ibimirim – PE, Brasil.
Paraguai	CPAP1; CPAP3; CPAP5; CPAP7 JD3916	S 18° 59' 02'' W 57° 39' 32''	Rio Paraguai, Corumbá – MS, Brasil.
Paraguai	CP249; CP269; CP270; CP277	S 16° 03' 45'' W 57° 41' 42''	Rio Paraguai, Cáceres – MT, Brasil
Paraguai	B75; B76; B77; B81; B82	S 15° 04' 22'' W 57° 10' 12''	Pesqueiro Santa Fé, Barra do Bugre – MT, Brasil
Paraguai	CP02; CP08; CP10; CP26;	S 15° 05' 32'' W 57° 14' 92''	Rio Paraguai, Barra do Bugre – MT, Brasil
Paraguai	CP11; CP17; CP167; JD3696; JD3702; JD3710	S 14° 30' 07'' W 57° 34' 39''	Córrego São José, Tangará da Serra – MT, Brasil
Paraguai	CP464	S 14° 48' 02'' W 57° 46' 29''	Rio Sepotuba, Tangará da Serra – MT, Brasil.
Amazonas	CP301; CP487	S 15° 40' 48'' W 56° 04' 13''	Rio Cuiabá, Cuiabá – MT, Brasil
Amazonas	CP222; CP228; CP229; CP245	S 15° 12' 51'' W 59° 20' 31''	Rio Guaporé, Pontes e Lacerda – MT, Brasil
Amazonas	CP126; CP127; CP128; CP134; CP142; CP151; CP144; CP154	S 13° 19' 29'' W 57° 36' 17''	Rio Sangue, Campo Novo do Parecis – MT, Brasil
Amazonas	CP73; CP443; CP444; CP446	S 12° 57' 17'' W 58° 43' 42''	Fazenda Céu Azul, Sapezal – MT, Brasil
Amazonas	CP523; CP524;	S 13° 11' 11'' W 56° 41' 18''	Rio Arinos, Sapezal – MT, Brasil
Amazonas	AA126; AA127; AA130; AA131; MM2; MM3; MM4;	S 12° 42' 03'' W 55° 45' 41''	Rio Teles Pires, Sorriso – MT, Brasil
Amazonas		S 9° 38' 11'' W 56° 00' 25''	Rio Teles Pires, Alta Floresta – MT, Brasil

Tabela II.1 Continuação

Bacia hidrográfica	Identificação da amostra	Coordenadas GPS	Local
Amazonas	MM5; MM6; MM13; MM14; OR8	S 9° 38' 11'' W 56° 00' 25''	Rio Teles Pires, Alta Floresta – MT, Brasil
Amazonas	AA129; MM07; MM08	S 9° 42' 51'' W 55° 51' 01''	Lagoa Azul, Alta Floresta – MT, Brasil.
Amazonas	JD4109; JD4110; JD4113; JD4586; JD4589; JD4600; JD2963; JD2918	S 11° 24' 44'' W 61° 44' 11''	Rio Machado, Cacoal – RO, Brasil
Amazonas	JD2916; JD2974	S 10° 53' 04'' W 61° 56' 28''	Rio Machado, Ji-Paraná – RO, Brasil
Amazonas	JD2978	S 9° 35' 58'' W 64° 55' 06''	Rio Madeira, Porto Velho – RO, Brasil
Amazonas	EE102; EE103;	S 10° 9' 48'' W 59° 27' 12''	Rio Jamarí, Porto Velho – RO, Brasil
Amazonas	EE104; EE105; EE106	S 10° 9' 48'' W 59° 27' 12''	Jus. Dardanelos, Aripuanã – MT.
Amazonas	WS45; WS62	S 10° 9' 48'' W 59° 27' 12''	Jusante de Dardanelos, Aripuanã – MT, Brasil
Tocantins	CIT1247; CIT1251	S 6° 38' 55'' W 52° 0' 15''	Rio Xingu, Rio Maria – PA, Brasil
Tocantins	WS51; WS54; WS55; WS56; WS72; WS74	S 15° 54' 25'' W 52° 16' 58''	Barra do Garças – MT, Brasil.
Parnaíba	TR02; TR03; TR04	S 58° 52' 34'' W 49° 43' 14''	Rio Araguaia, Pau D'arco – PA, Brasil.
Amazonas	EE100; EE101	S 8° 29' 06'' W 45° 44' 43''	Rio Parnaíba, Tasso Fragoso – MA, Brasil.
Amazonas	EE113; EE118; EE119	S 5° 12' 22'' W 60° 40' 46''	Lago Xadá, Novo Aripuanã – AM, Brasil
Amazonas	MAM1	S 9° 35' 58'' W 64° 55' 06''	Rio Juruá, Juruá – AM, Brasil
Amazonas	JP2804	S 3° 19' 56'' W 64° 43' 55''	Rio Solimões, Tefé – AM, Brasil
Amazonas	JAU; KM77	S 3° 04' 55'' W 60° 00' 11''	Rio Mindu, Manaus – AM, Brasil
Amazonas	JP2787	S 3° 05' 52'' W 60° 01' 18''	Manaus – AM, Brasil.
Amazonas	DM6	S 2° 27' 43'' W 58° 13' 10''	Rio Capucapu, Santa Maria – AM, Brasil
Orinoco	W1; W2; W4;	N 0° 02' 42'' W 51° 14' 37''	Rio Matapi, Macapá – AP, Brasil
Caroni	K14; K15	N 5° 30' 23'' W 60° 15' 19''	Caño Maraca, Estado Portuguesa, Venezuela
Magdalena	NI1; NI2; NI3, NI4, NI5	N 10° 35' 13'' W 61° 20' 48''	Rio Caroni, norte de Trinidad, Trinidad-Tobago
Magdalena	NI11, NI12, NI13, NI14, NI15, NI16, NI17	N 2° 44' 75'' W 75° 25' 72''	Córrego La Boa, Yaguará, Huila, Colômbia.
Magdalena	NI18	N 10° 15' 28'' W 75° 11' 9''	Pantanal Zarzal, Mahates, Bolivar, Colômbia.
		N 10° 24' 12'' W 75° 3' 2''	Pantanal Los Chivos, Manatí, Atlântico, Colômbia.

O DNA foi extraído a partir de tecidos fixados em etanol (fígado, músculo epaxial, ou filamentos branquiais) seguindo a metodologia de Boyce e colaboradores (1989). O gene ATP sintase 6 (*ATPase6*) foi amplificado com os iniciadores L8524 e H9236 (Quenouille *et al.*, 2004) e o gene ativador de recombinação 2 (*RAG2*) amplificado com os iniciadores RAG2aF, RAG2bR (Calcagnotto *et al.*, 2005) e 176R (Oliveira *et al.*, 2011). Em ambas as reações, o DNA foi sintetizado em 50 µL de reação contendo 0,4 µL de dNTPs (20 mM), 5 µL de tampão de reação (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 0,4 µL de MgCl₂ (100 mM), 2 µL de cada iniciador (0,01 mM), 0,4 µL (2,5 U) de *Taq* DNA polimerase (Phonetrria), 2 µL de DNA molde (100 ng/µL) e 37,8 µL de H₂O. Para *ATPase6*, as condições do PCR foram as seguintes: 94 °C (2 min), cinco ciclos de 94 °C (45 s), 54 °C (45 s) e 72 °C (1,5 min) e 29 ciclos de 94 °C (45 s), 58 °C (45 s) e 72 °C (1,5 min). Para *RAG2*, as condições de PCR seguiram: 95 °C (5 min), 30 ciclos de 95 °C (30 s), 48 °C (45 s) e 72 °C (1,5 min) com uma extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram purificados usando PEG 8000 (20% polyethyleneglycol, 2,5 M NaCl) e o sequenciamento realizado na plataforma de sequenciamento da Macrogen (Seoul, Coréia do Sul).

As sequências foram alinhadas em CLUSTAL W (Higgins *et al.*, 1994) um implemento do software MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). A qualidade de todas as sequências foi checada por observação direta dos cromatogramas em MEGA 5.0 e as sequências de má qualidade foram descartadas e o sequenciamento daquela amostra refeito. A inferência bayesiana foi feita com dez milhões de cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) no software BEAST 1.5.1 (Drummond & Rambaut, 2007) e a cada 1000 gerações uma árvore foi amostrada. O modelo de evolução molecular que melhor ajustou aos dados foi escolhido pelo programa MrModeltest 2 (Nylander,

2004). Vinte e cinco por cento das primeiras gerações MCMC foram descartadas e as relações filogenéticas e probabilidades posteriores estimadas com as árvores restantes. As topologias com probabilidades posteriores maiores que 0,95 foram consideradas bem sustentadas (Wilcox *et al.*, 2002). A análise de máxima parcimônia foi realizada em PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). As buscas heurísticas consistiram em 1000 adições aleatórias das sequências utilizando o algoritmo TBR. O sinal filogenético foi estimado usando 1000 pseudorreplicações de bootstrap (Felsenstein, 1985).

O tempo de divergência molecular foi estimado usando o gene *ATPase6* no software BEAST 1.5.1 (Drummond & Rambaut, 2007). A calibragem do relógio molecular foi baseada na idade mínima de separação da bacia hidrográfica do rio Magdalena das demais bacias hidrográficas *cis-andinas* pela cordilheira oriental dos Andes, estimada à aproximadamente 12 milhões de anos (Hoorn *et al.*, 1995). Assumiu-se que o soerguimento da cordilheira oriental andina foi o evento cladogenético responsável pela divergência das populações presentes na porção baixa do rio Magdalena (ver cap.1), com intervalo de confiança de 95%. O Fator Bayes $2\ln$ foi calculado para as hipóteses filogenéticas com e sem relógio molecular estrito no programa Tracer v.1.5.0 (Rambaut & Drummond, 2009). Valores de Fator Bayes ≥ 10 foram considerados suficientes para rejeitar a hipótese nula (Kass & Raftery, 1995).

A distância molecular média entre e dentro dos haplogrupos foi estimada em MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Os sítios polimórficos dos genes *ATPase6* e *RAG2* foram estimados utilizando o software DnaSP (Librado & Rozas, 2003) e as redes de haplótipos foram construídas com o software Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology

Ltd.). Neste trabalho, foi utilizada a nomenclatura dos cariomorfos de *Hoplias malabaricus* proposta por Bertollo e colaboradores (2000).

4. RESULTADOS

Foram alinhados 633 pb do gene *ATPase6* com 256 sítios variáveis e 220 sítios informativos para parcimônia. A razão transição/transversão foi 5,7 sugerindo que as taxas de substituições não estão saturadas. O modelo de evolução molecular que melhor se ajustou aos dados foi GTR+I+G. O método de inferência bayesiana indicou cinco haplogrupos. O haplogrupo I foi formado por haplótipos de espécimes coletados na porção alta da bacia hidrográfica do rio Magdalena (N=5). O haplogrupo II foi formado por haplótipos de espécimes coletados na cabeceira do rio Tocantins (N=2) e cabeceira do alto Paraná (N=1). O haplogrupo III foi formado por haplótipos de espécimes coletados na porção baixa da bacia hidrografia do rio Magdalena (N=8), na bacia do rio Orinoco (N=3), na bacia hidrográfica amazônica (N=47), do rio Tocantins (N=6), Parnaíba (N=3), São Francisco (N=32), nas bacias costeiras do nordeste do Brasil (N=10), nas bacias hidrográficas do Paraguai (N=3), Uruguai (5), alto rio Paraná (14) e no rio Caroni (N=2). O haplogrupo IV foi formado por haplótipos de espécimes coletados nas bacias hidrográficas dos rios Paraguai (N=22) e Uruguai (17), nas porções altas do rio Paraná (N=9) e na bacia amazônica (N=18). O haplogrupo V foi formado por haplótipos de espécimes coletados nas bacias costeiras do sul/sudeste do Brasil (N=6), leste (N=18) e espécimes coletados nos tributários do alto rio Paraná (N=31), baixo rio Paraná (N=3), alto rio São Francisco (N=5) e do rio Uruguai (N=9). O método da máxima parcimônia gerou os mesmos cinco haplogrupos indicados pela inferência bayesiana, no entanto, os nós coalescentes entre os haplótipos dos haplogrupos III e V apresentaram baixos valores

de bootstrap (Fig. 1). O haplogrupo I apresentou elevada distância molecular dos demais haplogrupos e uma pequena distância entre os haplótipos que o compõem. O haplogrupo III apresentou pequenas distâncias moleculares dos demais haplogrupos e a segunda maior distância molecular média entre os haplótipos que o compõe (Tabela 2).

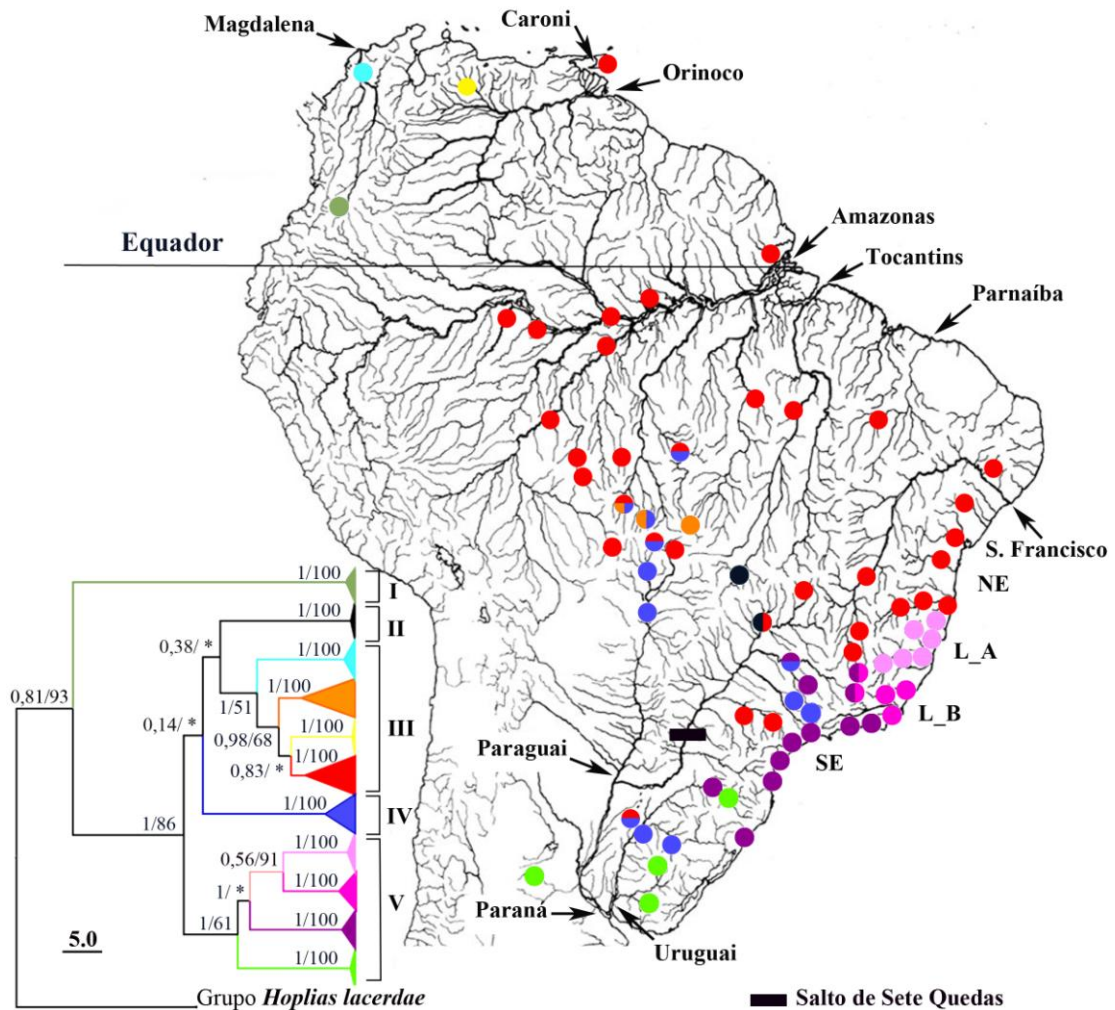


Figura II.1 Distribuição dos haplogrupos indicados a partir do padrão de variação do gene *ATPase6* de *Hoplias malabaricus*.

Os valores nos nós correspondem à probabilidade posterior e aos valores de bootstrap, obtidos na inferência bayesiana e máxima parcimônia, respectivamente. * indica politomia e a barra a distância molecular pela inferência bayesiana. Os algarismos romanos indicam os haplogrupos. As bacias costeiras do nordeste, leste A, leste B e sudeste do Brasil encontram-se nas regiões: NE, L_A, L_B e SE, respectivamente. A foz de cada bacia hidrográfica é indicada pelas setas. As localidades de coleta são representadas no mapa com as cores correspondentes aos sub-haplogrupos indicados pelo gene *ATPase6*.

Tabela II.2 Distância molecular entre e dentro dos haplogrupos gerados pelas análises de bayesiana e máxima parcimônia com o gene *ATPase6* em populações de *Hoplias malabaricus*.

	haplogrupo I	haplogrupo II	haplogrupo III	Haplogrupo IV	Haplogrupo V
haplogrupo I	0,004				
Haplogrupo II	0,175	0,003			
haplogrupo III	0,156	0,123	0,040		
haplogrupo IV	0,158	0,139	0,097	0,015	
haplogrupo V	0,172	0,142	0,110	0,122	0,069

Os valores abaixo da diagonal correspondem à distância entre os haplogrupos. Os valores na diagonal correspondem à distância molecular média dentro dos haplogrupos

Os valores ESS (*Effective Sample Size*) checados em Tracer v.1.5.0 foram maiores que 112 indicando que os parâmetros da evolução molecular e as estimativas de tempo de divergência molecular são confiáveis, considerando a amostragem desse trabalho. O Fator Bayes $2\ln$ para a comparação das hipóteses filogenéticas sem ($\ln = -5524,229$) e com o relógio molecular estrito ($\ln = -5524,487$) foi de 0,258, indicando semelhança nos valores de verossimilhança entre as árvores e sugerindo que é adequado assumir o relógio estrito nas estimativas de tempo de coalescência. O relógio molecular sugere que a divergência entre *Hoplias malabaricus* e o grupo *Hoplias lacerdae* ocorreu no Eoceno médio (Fig. 2). O relógio molecular indicou que o haplótipo coalescente entre os haplótipos do haplogrupo alto Magdalena e os demais haplótipos de *H. malabaricus* existia no início do Oligoceno. O haplogrupo II, restrito as cabeceiras do rio Tocantins e alto Paraná, apresentou uma divergência molecular do haplogrupo III correspondente a um haplótipo coalescente no Mioceno médio. Dentro do haplogrupo III, o sub-haplogrupo formado por amostras do rio Orinoco apresentou uma divergência molecular correspondente a um tempo de isolamento desde o início do Mioceno inferior e o sub-haplogrupo Parnaíba/São Francisco/bacias costeiras do nordeste apresentaram uma divergência molecular dos espécimes amazônicos correspondente a um haplótipo coalescente no Plioceno.

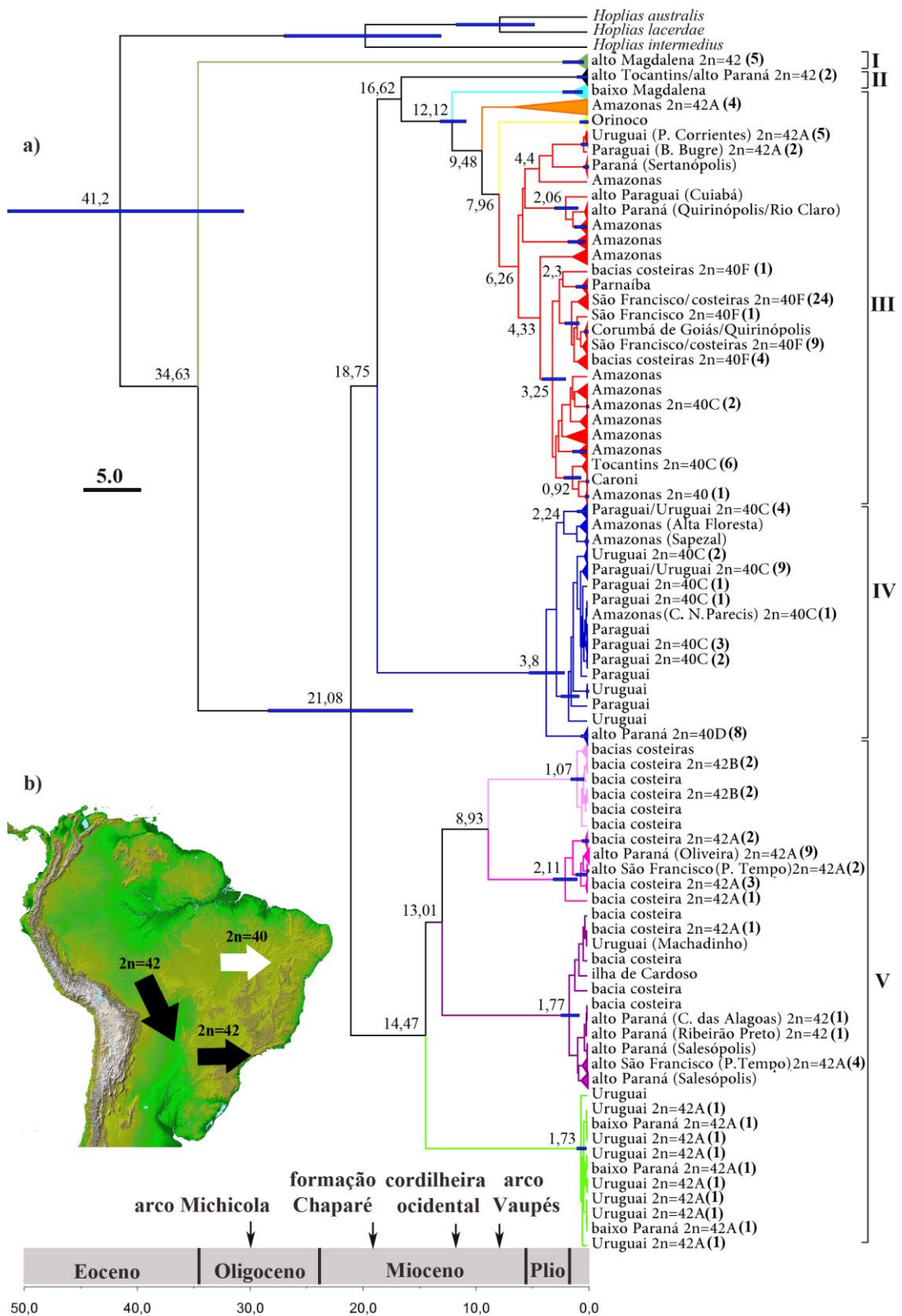


Figura II.2 Estimativas de tempo de divergência molecular entre os haplogrupos e cariomorfos de *Hoplias malabaricus* e rotas de dispersão a partir do norte/noroeste da América do Sul.

Em (a) relógio molecular calibrado em 12 Ma a divergência do haplogrupo baixo Magdalena das demais populações ao leste da cordilheira oriental dos Andes. Os

valores nos nós indicam o tempo de divergência molecular em milhões de anos (Ma) e as barras azuis o desvio padrão. As setas direcionadas para a escala de tempo indicam a idade mínima da formação geológica. Em parênteses o número de espécimes cariotipados. Notar que o tempo de divergência molecular dos haplogrupos IV e V das demais populações ao leste da cordilheira dos Andes são congruente com o período de capturas de cabeceiras do paleo-Amazonas para o paleo-Paraná-Paraguai, em decorrência da formação Chaparé. Da mesma forma, a coalescência entre os haplótipos amazônicos e do rio Orinoco é coincidente com a fase final de formação do arco Vaupés. Em (b) as duas prováveis rotas de dispersão das populações de *H. malabaricus* a partir do norte/noroeste da América do Sul. A seta branca indica a dispersão de populações com $2n=40$ cromossomos para as bacias hidrográficas dos rios Parnaíba, São Francisco e costeiros no nordeste do Brasil. As setas pretas indicam dispersões de populações com $2n=42$ cromossomos para um paleo-Paraná-Paraguai e em seguida para as bacias costeiras do sul, sudeste e leste do Brasil. Imagem topográfica baseada em radar interferometry (SRTM-NASA).

Os haplogrupos IV e V apresentaram haplótipos amplamente distribuídos no centro-sul, sul e sudeste do Brasil e apresentam uma divergência dos demais haplótipos ao leste da cordilheira dos Andes correspondente à existência de um haplótipo coalescente no Mioceno inferior. A estimativa do tempo de divergência molecular entre os quatro sub-haplogrupos do haplogrupo V foi correlacionada à distância geográfica entre as regiões de distribuição dos haplótipos. A época de coalescência entre os haplótipos dentro de cada um destes quatro sub-haplogrupos foi estimada no Pleistoceno inferior (Fig. 2).

Os haplogrupos I e II apresentaram os haplótipos com a distribuição mais restrita dentre todos os haplogrupos. O haplogrupo I só foi amostrado no alto rio Magdalena e o haplogrupo II em uma localidade na cabeceira do rio Tocantins e outra na cabeceira do rio Paraná, próxima a bacia hidrográfica do rio Tocantins. O haplogrupo III foi formado por haplótipos coletados em 16 localidades na bacia hidrográfica amazônica, quatro na bacia do rio São Francisco, quatro no alto Paraná, seis localidades nas bacias costeiras do nordeste, duas localidades no alto Paraguai e em um ponto amostral nas bacias hidrográficas dos rios: Magdalena, Caroni, Uruguai, Tocantins e Parnaíba (Fig. 3). A construção de uma rede de haplótipos com

o gene *ATPase6* das amostras presentes no haplogrupo III apresentou 70 haplótipos com 0,038 de diversidade nucleotídica e 0,96 de diversidade haplotípica. A região amazônica apresentou o maior número de haplótipos, com um elevado número de substituições nucleotídicas entre eles. Os espécimes coletados no rio Tocantins apresentaram um haplótipo com apenas um sítio de substituição alterado em relação ao haplótipo amazônico mais relacionado, seguido pelo haplótipo presente nos espécimes do rio Caroni (4 substituições) e Parnaíba (9 substituições). Os espécimes do rio São Francisco e bacias costeiras do nordeste apresentaram haplótipos mais aparentados com aqueles dos espécimes do rio Parnaíba. Os haplótipos (presentes no haplogrupo III) das traíras coletadas no rio Paranaíba foram derivados daqueles observados nas populações da bacia hidrográfica do rio São Francisco. Os espécimes coletados na bacia hidrográfica do rio Magdalena e Orinoco possuem haplótipos mais aparentados entre eles do que com as demais populações amazônicas. De forma semelhante, os haplótipos coletados nos rios Paranapanema e Uruguai foram mais aparentados entre si do que com os haplótipos presentes em espécimes da bacia hidrográfica amazônica. Dois haplótipos altamente divergentes foram coletados em espécimes do alto rio Paraguai. Um destes é compartilhado com espécimes coletados no rio Uruguai e o outro haplótipo foi mais relacionado aos espécimes amazônicos (Fig. 3).

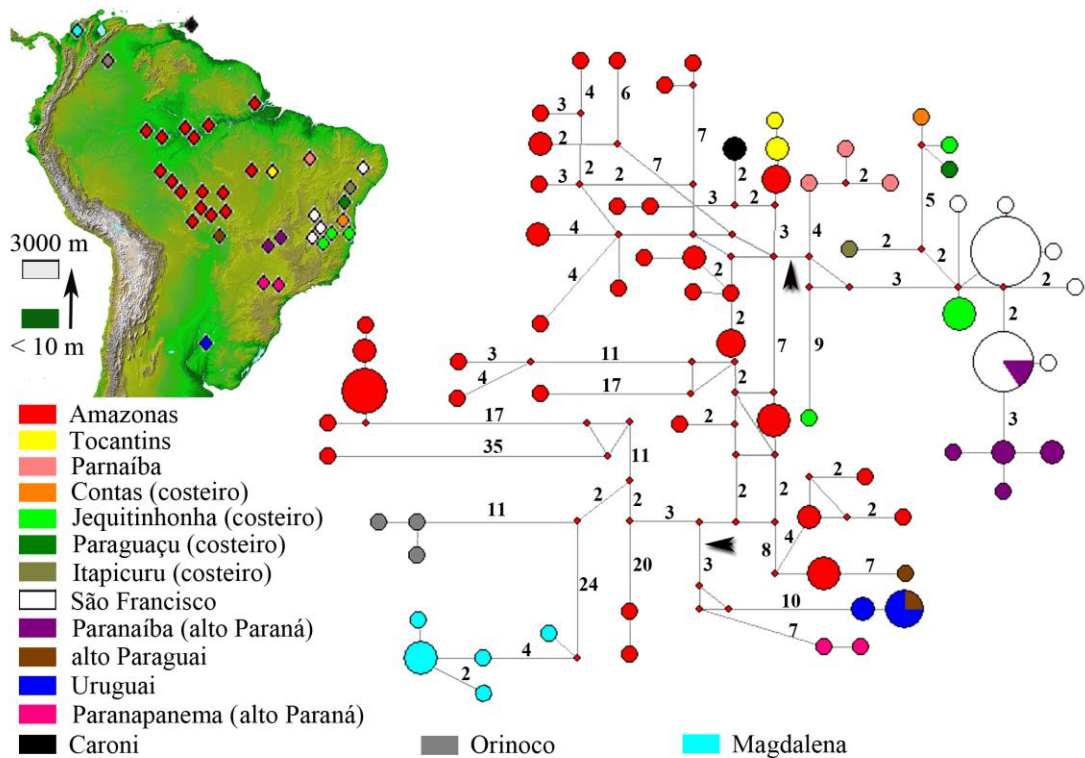


Figura II.3 Rede de haplótipos do gene *ATPase6* com as amostras presentes no haplogrupo III.

As cores dos haplótipos correspondem à bacia hidrográfica de coleta. Os locais onde os haplótipos foram amostrados estão representados no mapa de altitude da América do sul. Os valores nos ramos da rede de haplótipos representam o número de substituições nucleotídicas (exceto quando foi observada apenas uma substituição). Os pontos vermelhos indicam os haplótipos não amostrados e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. As pontas de seta indicam os ramos de expansão dos haplótipos a partir daqueles da bacia hidrográfica amazônica. Imagem topográfica baseada em radar interferometry (SRTM-NASA).

O haplogrupo IV foi formado por haplótipos coletados em três localidades das bacias hidrográficas dos rios Paraguai, Uruguai, alto Paraná e Amazonas (Fig. 4). A construção de uma rede de haplótipos com o gene *ATPase6* das amostras presentes no haplogrupo IV apresentou 23 haplótipos com 0,014 de diversidade nucleotídica e 0,92 de diversidade haplotípica. O maior número de haplótipos foi observado no sistema Paraguai/Uruguai e não apresentaram uma estruturação filogeográfica entre estas bacias. Os haplótipos coletados na bacia amazônica presentes no haplogrupo IV correspondem a espécimes capturados próximos ao divisor de águas com o rio

Paraguai e são mais aparentados aos haplótipos de espécimes coletados nesta bacia. Os espécimes coletados em tributários do alto rio Paraná (rios Tietê e Grande) apresentaram haplótipos com um elevado número de substituições nucleotídicas (13 sítios) em relação ao haplótipo da bacia hidrográfica do rio Uruguai mais aparentado.

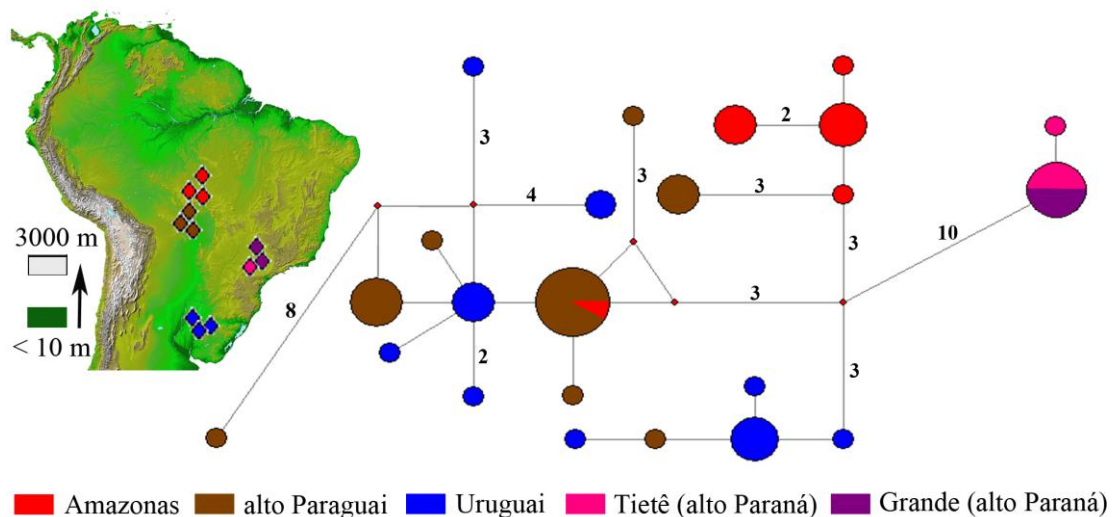


Figura II.4 Rede de haplótipos do gene *ATPase6* com as amostras presentes no haplogrupo IV.

As cores dos haplótipos correspondem à bacia hidrográfica de coleta. Os locais onde os haplótipos foram amostrados estão representados no mapa de altitude da América do sul. Os valores nos ramos da rede de haplótipos representam o número de substituições nucleotídicas (exceto quando foi observada apenas uma substituição). Os pontos vermelhos indicam os haplótipos não amostrados e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Imagem topográfica baseada em radar interferometry (SRTM-NASA).

O haplogrupo V foi formado por haplótipos coletados em uma localidade na bacia hidrográfica do baixo rio Paraná, quatro localidades na bacia hidrográfica do rio Uruguai, em seis localidades nas bacias costeiras do sul/sudeste do Brasil, em nove pontos amostrais nas bacias costeiras do leste do Brasil, quatro localidades em drenagens do alto rio Paraná e uma no alto rio São Francisco (Fig. 5). A construção da rede de haplótipos com o gene *ATPase6* das amostras presentes no haplogrupo V apresentou 41 haplótipos com 0,061 de diversidade nucleotídica e 0,963 de diversidade haplotípica e formou quatro sub-haplogrupos com uma forte correlação

geográfica e distantes por um elevado número de substituições nucleotídicas. O sub-haplogrupo sul foi formado por haplótipos presentes em espécimes coletados em um tributário no baixo rio Paraná e afluentes do rio Uruguai. O sub-haplogrupo sudeste foi formado por haplótipos presentes em espécimes coletados nas bacias costeiras do sul/sudeste do Brasil, no alto rio Paraná (rio Tietê), no rio Grande e em um tributário do alto rio São Francisco. Os haplótipos coletados nas bacias hidrográficas do alto Paraná e São Francisco foram mais aparentados a haplótipos de espécimes coletados no rio Paraíba do Sul. O sub-haplogrupo leste A foi formado por espécimes coletados nas bacias costeiras dos rios Doce, São Mateus, Mucuri, Itanhém e Jucuruçu. Por fim, o sub-haplogrupo leste B compreendeu haplótipos de espécimes coletados nas bacias costeiras dos rios Macaé, São João, Paraíba do Sul e Itabapoana, e em tributários do rio Grande e alto rio São Francisco. Os haplótipos coletados nas bacias hidrográficas continentais presentes no sub-haplogrupo leste B também foram mais aparentados com haplótipos de espécimes coletados no rio Paraíba do Sul.

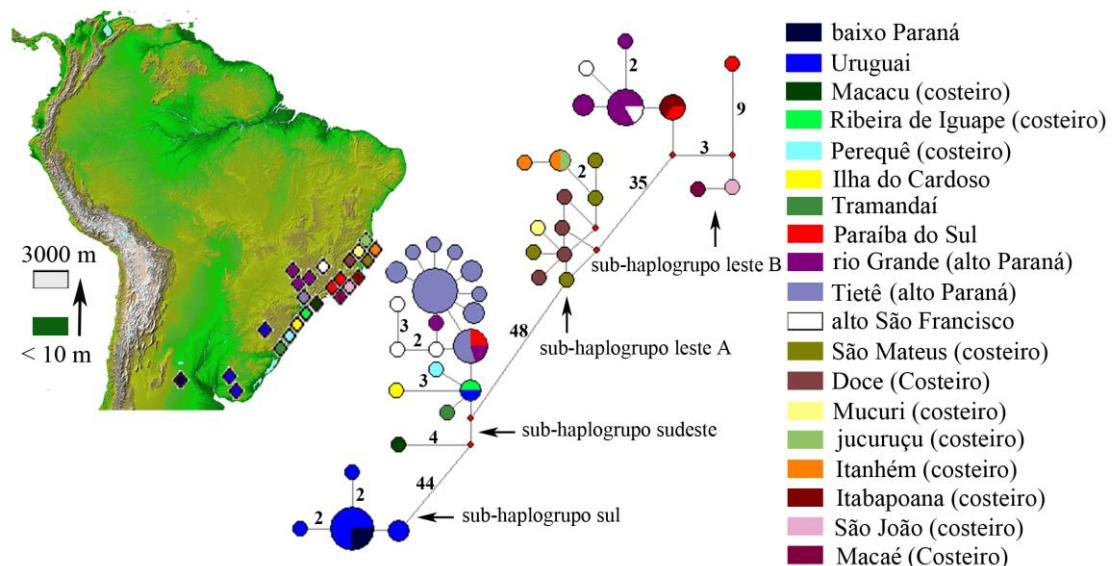


Figura II.5 Rede de haplótipos do gene *ATPase6* com as amostras presentes no haplogrupo V.

As cores dos haplótipos correspondem à bacia hidrográfica de coleta. Os locais onde os haplótipos foram amostrados são representados no mapa de altitude da América do sul. Os valores nos ramos da rede de haplótipos representam o número de substituições nucleotídicas (exceto quando foi observada apenas uma substituição).

Os pontos vermelhos indicam os haplótipos não amostrados e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Imagem topográfica baseada em radar interferometry (SRTM-NASA).

As populações de *Hoplias malabaricus* com o número diplóide de 40 cromossomos não formaram um grupo monofilético com o gene *ATPase6* (Fig. 2). Os haplogrupos I, II e V são formados por haplótipos de espécimes que apresentam $2n=42$ cromossomos (Santos *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2013; J.A. Dergam não publicado; N.E. Ibágon não publicado; Grassi, 2005). O haplogrupo III foi formado por haplótipos de espécimes com $2n=40$ e 42 cromossomos. Os espécimes com cariomorfo $2n=42A$ neste haplogrupo foram coletados em drenagens amazônicas localizadas nas porções altas do Escudo Cristalino Brasileiro (Campo Novo do Parecis, Sapezal e Sorriso), no alto Paraguai (Lima, 2008) e no rio Uruguai (Dergam, 1996). Os espécimes com $2n=40C$ presentes no haplogrupo III foram coletados na bacia hidrográfica amazônica (Sampaio, 2011; J. Porto não publicado) e são grupo irmão das populações com cariomorfo $2n=40F$ das bacias costeiras do nordeste do Brasil e rio São Francisco (Santos *et al.*, 2009; Jacobina *et al.*, 2009) (Fig. 2). A época de coalescência dos haplótipos presentes nos espécimes com cariomorfo $2n=40C$ e $2n=40F$ foi estimada no Plioceno. O haplogrupo IV foi formado por espécimes com cariomorfo $2n=40C$ coletados no alto rio Paraguai (Lima, 2008) e rio Uruguai (Dergam, 1996; Bertollo *et al.* 2000) e por traíras com cariomorfo $2n=39/40D$ coletadas no alto rio Paraná (Bertollo *et al.* 2000). A divergência molecular entre o cariomorfo $2n=40C$ - das bacias hidrográficas dos rios Paraguai e Uruguai - e o cariomorfo $2n=39/40D$ também correspondeu a um haplótipo coalescente no Plioceno.

As sequências *RAG2* foram obtidas em espécimes coletados na bacia hidrográfica do rio Magdalena (N=13), Orinoco (N=5), Caroni (N=2), Amazonas

(N=59), Tocantins (N=8), São Francisco (N=9), Uruguai (N=19), Paraguai (N=25), Paraná (N=10) e bacias costeiras do Brasil (N=21). Foram alinhados 1.032 pb com 98 sítios variáveis, 65 sítios informativos para parcimônia e uma baixa razão média de transição/transversão (1,34). As razões de transição/transversão foram de 0,33 para a primeira base do códon, 1,19 para a segunda e 2,63 para a terceira base. A rede de haplótipos formou haplogrupos parcialmente congruentes com os cinco haplogrupos indicados pelas análises de inferência bayesiana e máxima parcimônia com o gene *ATPase6* (Fig. 6). Alguns espécimes de *Hoplias malabaricus* coletados no alto rio Juruena e no alto rio Paraguai apresentaram o gene nuclear *RAG2* aparentado com outros espécimes da bacia hidrográfica de coleta e o gene mitocondrial *ATPase6* indicando dispersão a partir do sistema hidrográfico vizinho. Trinta e sete espécimes coletados nos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, presentes no haplogrupo IV, tiveram o gene *RAG2* sequenciado. Dentre estas trinta e sete sequências do gene *RAG2* foram identificados 20 haplótipos, aproximadamente um novo haplótipo a cada duas amostras sequenciadas. Os espécimes presentes no haplogrupo II, indicado pela análise do gene *ATPase6*, apresentam o gene *RAG2* mais aparentados às populações com $2n=42$ cromossomos do sul e sudeste da América do Sul.

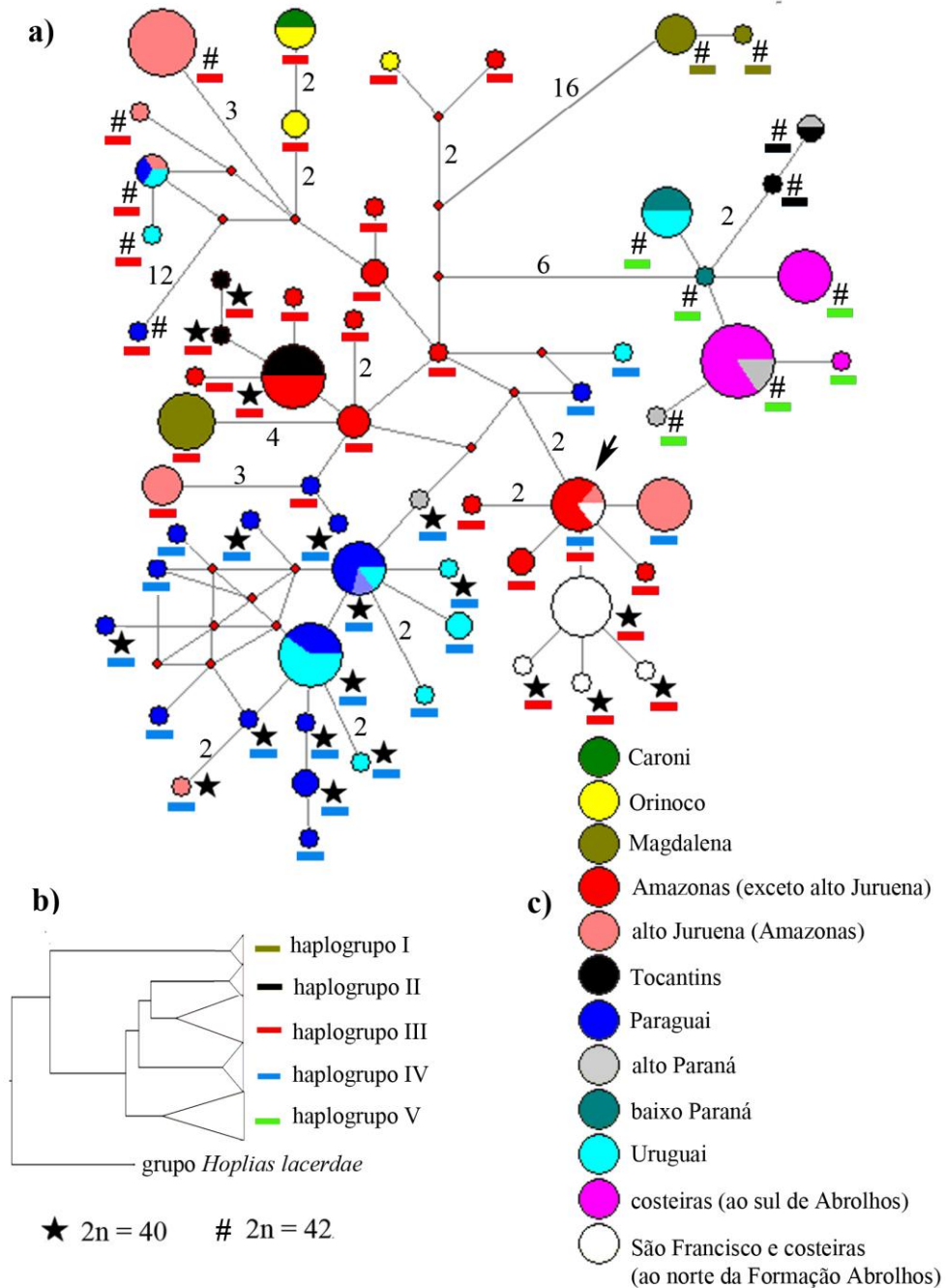


Figura II.6 Correlação entre o gene nuclear, haplótipo mitocondrial e número diploide em *Hoplias malabaricus*.

Em (a) rede de haplótipos com o gene nuclear *RAG2*. Mais de uma substituição nucleotídica entre os haplótipos são representadas nos ramos da rede. O tamanho dos haplótipos é proporcional à frequência deles na amostragem. Os símbolos que acompanham os haplótipos correspondem ao número diploide e as barras coloridas ao haplogrupo indicado pelo gene mitocondrial *ATPase6* do espécime amostrado (b). Notar que os 24 espécimes que possuem haplótipos mitocondriais no haplogrupo IV e foram cariotipados apresentaram 12 haplótipos *RAG2*. A seta indica um haplótipo compartilhado entre traíras que possuem o gene mitocondrial do haplogrupo III e IV. Em (c) legenda indicando a bacia hidrográfica de coleta dos haplótipos de acordo com as cores destes na rede.

5. DISCUSSÃO

5.1 *A idade mínima do gênero Hoplias*

A estimativa de coalescência entre os grupos *Hoplias malabaricus* e *Hoplias lacerdae* no Eoceno médio é uma hipótese congruente com os registros fósseis. As mandíbulas e dentes mais antigos de Erythrinidae são do final do Cretáceo e assemelham-se à dentição do gênero *Hoplias*, sendo atribuídos a um novo gênero, mas com a observação “cf. *Hoplias* nov. sp.” (Gayet, 1991; Gayet & Meunier, 1998). Estes fósseis foram encontrados nas localidades bolivianas de Água Clara e Pajcha Pata e na formação Uberaba em Minas Gerais, Brasil (Gayet & Meunier, 1998). Depósitos no início do Paleoceno superior em Tiupampa e Criadero de Loro, na Bolívia, também apresentam vestígios desse nov. gen. ou *Hoplias* nov. sp.. Embora a existência de *Hoplias* no final do Cretáceo não esteja bem definida, dentes e mandíbulas do Mioceno médio-superior encontradas na região do Equador, Peru e Colômbia são pertencentes a espécies desse gênero (Roberts, 1975; Lundberg, 1997). Apesar da idade mínima proposta pelo relógio molecular para *Hoplias* não seja o Cretáceo, a divergência molecular encontrada entre *H. malabaricus* e *H. lacerdae* indica o Eoceno médio como a idade mínima do gênero.

5.2 *A idade mínima e o centro de origem de Hoplias malabaricus*

A divergência eocênica-oligocênica do haplogrupo I, restrito ao alto rio Magdalena, sugere que *Hoplias malabaricus* já estava presente no sistema de rios que drenavam o oeste amazônico rumo ao norte da América do Sul de 33 a 24 Ma,

antes do presente. Pulsos de soerguimento da cordilheira dos Andes no Sul do Peru e na região central do Chile são bem documentados do Eoceno até o Oligoceno médio na chamada Orogênese Incaica (Lundberg *et al.*, 1998; Charrier *et al.*, 2009), mas não são indicados, nesse período, na porção norte da cordilheira. Contudo, o gradual soerguimento da cordilheira andina, possivelmente, levou a um isolamento local de populações de *H. malabaricus* e determinou a elevada divergência molecular dos haplótipos presentes na porção alta do atual rio Magdalena (haplogrupo I). A história paleohidrológica da bacia hidrográfica do rio Magdalena tornou-se independente da bacia amazônica há 13,5 - 11,8 Ma, com o desenvolvimento da cordilheira oriental dos Andes (Hoorn *et al.*, 1995). Este evento foi o responsável pela divergência molecular entre a população presente na porção baixa do rio Magdalena daquelas ao leste dos Andes. As populações próximas à cabeceira do rio Magdalena possuem o plesiomorfo 2n=42 cromossomos e as populações próximas à foz apresentam o gene *RAG2* mais aparentado com espécimes amazônicos com 2n=40 cromossomos. Provavelmente, as traíras *H. malabaricus* do baixo rio Magdalena possuem 2n=40 cromossomos.

Durante o soerguimento da cordilheira oriental dos Andes, as regiões correspondentes ao oeste amazônico e rio Orinoco ainda apresentavam o curso em direção ao mar do Caribe, como um único sistema de drenagem (Wesselingh & Hoorn, 2011). O tempo de divergência molecular estimado entre os haplótipos coletados na bacia hidrográfica do rio Orinoco e Amazonas (~8 Ma) é correspondente à fase final de formação do arco Vaupés (10 - 8 Ma), que levou à separação do paleo-Amazonas-Orinoco e formação das modernas bacias hidrográficas dos rios Orinoco e Amazonas (Hoorn *et al.*, 1994).

A elevada distância genética entre os haplótipos *ATPase6* do haplogrupo III, a maior diversidade haplotípica observada dentro deste haplogrupo e os quatro sub-haplogrupos formados são reflexos das dinâmicas vicariantes nas bacias hidrográficas ao norte da América do Sul a partir do Mioceno. O sub-haplogrupo restrito às cabeceiras do rio Juruena (sub-haplogrupo laranja na fig. 1 e 2) evidencia uma vicariância entre populações de traíras amazônicas anterior à separação do paleo-Amazonas-Orinoco nas modernas drenagens dos rios Amazonas e Orinoco. Populações de *H. malabaricus* próximas aos divisores de águas têm apresentado elevada distância genética em relação às demais populações da bacia, em decorrência de barreiras físicas e ecológicas e de capturas de cabeceiras de bacias hidrográficas vizinhas (eg. Santos *et al.*, 2009; Lima & Ribeiro, 2011; cap.1). A bacia hidrográfica amazônica é o maior sistema fluvial do mundo e as grandes extensões de baixas altitudes favorecem recorrentes eventos de vicariância e posterior encontro da ictiofauna (Albert & Reis, 2011), o que também contribui para a diversidade de haplótipos *ATPase6* observados. Geralmente, as porções mais altas das bacias apresentam, com maior frequência, alterações verticais no curso das drenagens e isolamentos físicos e ecológicos impostos pelo relevo. Estas alterações permitem o abrigo de uma fauna isolada nas porções altas das bacias hidrográficas, as quais também podem apresentar linhagens capturadas a partir das drenagens vizinhas (Lima & Ribeiro, 2011).

5.3 A distribuição de Hoplias malabaricus na porção leste da América do Sul

A presença do haplogrupo mais divergente de *Hoplias malabaricus* na região norte/noroeste do continente, a maior diversidade de haplótipos *ATPase6* e distância

genética entre haplótipos na região amazônica, e o padrão de expansão dos haplótipos do haplogrupo III a partir da bacia amazônica indicam um vetor de colonização desse táxon do noroeste para o leste da América do Sul, após o Plioceno inferior. Os haplótipos *ATPase6* coletados nas bacias hidrográficas dos rios Tocantins, Parnaíba e São Francisco apresentam um número crescente de substituições nucleotídicas, no sentido oeste-leste, em relação aos haplótipos amazônicos. Até o final do Mioceno (11 Ma) a atual bacia amazônica era dividida pelo arco Purús em um sistema de drenagens ao leste e no sistema paleo-Amazonas-Orinoco, ao oeste. O fluxo do moderno rio Amazonas para o leste é bem documentado somente a partir do final do Mioceno (7 Ma), com o aumento da razão de sedimentos no leito da calha moderna deste rio (Lundberg *et al.*, 1998; Wesselingh & Hoorn, 2011). Assim, a história paleohidrológica comum do rio Amazonas com as drenagens na margem leste do continente, com consequente colonização de *H. malabaricus* nas bacias costeiras ocidentais, só seria possível após o Mioceno superior. De fato, a estimativa de coalescência entre as populações de *H. malabaricus* das bacias hidrográficas dos rios Parnaíba, São Francisco e costeiros do nordeste do Brasil corresponde ao Plioceno, uma época consideravelmente mais recente do que o indicado para a coalescência entre os sub-haplogrupos presentes nos sistemas hidrográficos ao oeste da América do Sul. Eigenmann (1909) já argumentava a respeito da semelhança da ictiofauna do rio São Francisco com aquela do rio Amazonas, um provável reflexo da história paleohidrológica comum entre estas drenagens. A estreita relação filogenética entre os haplótipos *ATPase6* presentes nas bacias costeiras do nordeste com a bacia hidrográfica do rio São Francisco provavelmente decorrem de eventos de capturas de cabeceiras entre tributários do rio São Francisco e das bacias costeiras do nordeste (Pereira *et al.*,

2013; Saadi, 1995). A semelhança da ictiofauna presente nas bacias costeiras do nordeste com o rio São Francisco também é atribuída aos recentes eventos de capturas de cabeceiras (Rosa *et al.*, 2004).

Evidências citogenéticas também corroboram com a hipótese de colonização da região leste do continente a partir de populações do norte/noroeste da América do Sul. Dos sete cariomorfos descritos para *Hoplias malabaricus* apenas dois não possuem registros na região amazônica ($2n=42B$ e $2n=39/40D$). Uma maior diversidade de cariomorfos nas drenagens amazônicas possivelmente é decorrente de uma história evolutiva mais antiga de *H. malabaricus* na região. Na bacia hidrográfica amazônica, o plesiomórfico cariomorfo $2n=42A$ é amplamente distribuído (Bertollo *et al.* 2000; cap. 1) e o cariomorfo $2n=40/41G$ é encontrado nos rios Aripuanã (MT), Trombetas (PA) e Madeira (RO). As fêmeas de *H. malabaricus* com o cariomorfo $2n=40/41G$ apresentam o mesmo número diploide e estrutura cariotípica idêntica ao cariomorfo $2n=40F$ e ambos possuem um sistema de cromossomos sexuais envolvendo o primeiro grande par de cromossomos do cariótipo. Estas evidências permitem inferir que os cariomorfos $2n=40/41G$ e $2n=40F$ sejam grupos irmãos (Santos *et al.*, 2009). Neste estudo, não foram amostrados espécimes de *H. malabaricus* com o cariomorfo $2n=40/41G$, mas as populações amazônicas com $2n=40C$ formaram um clado irmão às populações do leste da América do Sul que apresentam o cariomorfo $2n=40F$. Este cariomorfo é distribuído nas bacias costeiras do Suriname até o nordeste do Brasil com o limite sul sendo a Formação Abrolhos (Bertollo *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2013). Populações com $2n=40F$ também são encontradas nas porções baixas do rio Tocantins e amplamente distribuídas na bacia hidrográfica do rio São Francisco (Bertollo *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2013; cap. 1). As populações com $2n=42A$ encontradas na bacia

hidrográfica do rio São Francisco são restritas aos divisores de águas com a bacia hidrográfica do rio Grande, onde este cariomorfo é amplamente distribuído e, provavelmente, são decorrentes de dispersões a partir do alto rio Paraná (Santos *et al.*, 2009).

5.4 A distribuição de *Hoplias malabaricus* no centro-sul da América do Sul

A presença de populações de *Hoplias malabaricus* no alto rio Paraná com haplótipos derivados daqueles amplamente distribuídos na bacia hidrográfica do rio São Francisco sugere a presença de traíras com o cariomorfo $2n=40F$ no alto rio Paraná. Devido ao pequeno número de substituições nucleotídicas entre os haplótipos presentes em espécimes do rio São Francisco e do alto rio Paranaíba é provável que a origem das populações com $2n=40F$ do alto rio Paraná seja recente. Pelo menos dois eventos de dispersão de espécimes com $2n=42A$ da bacia hidrográfica amazônica para o sistema Paraná/Paraguai a partir do Plioceno inferior também são indicados pela rede de haplótipos *ATPase6* do haplogrupo III. Contudo, provavelmente já existiam populações de traíras *H. malabaricus* no alto rio Paraná antes do Plioceno, pois a presença desse táxon no sistema Paraguai/baixo rio Paraná/Uruguai foi estimada no Mioceno inferior. O cânion e salto de Sete Quedas, que limitava o alto e o baixo rio Paraná, começaram a se formar no Plioceno (Maack, 1968) e não foram encontrados registros de barreiras físicas que poderiam restringir *H. malabaricus* nas porções baixas da bacia.

A coalescência entre o haplogrupo III com os haplogrupos amplamente distribuídos no sul do continente (IV e V) corresponde à fase final de elevação da formação Chaparé. Esta formação geológica é decorrente de uma fase de compressão

e consequente soerguimento da parte central da Cordilheira dos Andes entre ~27 e ~19 Ma que levou a capturas de drenagens amazônicas para um paleo-Paraná-Paraguai (Sempere *et al.*, 1990; Lundberg *et al.*, 1998). Provavelmente, estas capturas de cabeceiras permitiram que populações de *H. malabaricus* aumentassem a distribuição para o sul do continente. Possivelmente, o evento de redução do número diploide de $2n=42A$ para $2n=40C$ ocorreu durante este período de expansão. Este cenário é consistente com a recuperação de dois haplogrupos altamente divergentes (IV com $2n=40$ e V com $2n=42$) nos tributários do rio da Prata (rios Paraguai, Paraná e Uruguai). Esta hipótese é reforçada pela ausência de sinal filogenético entre os haplogrupos III, IV e V. Eventos cladogenéticos rápidos não permitem recuperar uma relação dicotômica entre os clados.

O relógio molecular indica uma divergência no Mioceno médio-inferior entre o haplogrupo II e as demais populações de *H. malabaricus*. Contudo, são escassos os registros de alterações paleohidrográficas nas drenagens presentes nas porções centrais do Escudo Cristalino Brasileiro durante o Mioceno, consequentemente, é difícil inferir quais foram os eventos paleohidrológicos responsáveis pela distância molecular dos haplótipos presentes no haplogrupo II das demais populações do continente. Os espécimes presentes no haplogrupo II e aqueles com o carimorfo $2n=42A$ ao sul e sudeste da América do Sul formam um haplogrupo bem definido com o gene nuclear *RAG2*. No entanto, esta maior relação de parentesco com o gene nuclear pode ser decorrente de recente fluxo gênico entre espécimes com $2n=42A$ com haplótipos mitocondriais do haplogrupo II e V e não refletir as relações genealógicas no Mioceno. Embora tributários do alto Paraná, como os rios Corumbá e Paranaíba, possivelmente drenavam para o rio Tocantins até o Mioceno (Beurlen, 1970) a estreita relação filogenética entre os haplótipos coletados em São

Simão/Quirinópolis (bacia do Paranaíba) com aqueles coletados em Barra do Garças indica uma história hidrológica mais recente em comum entre o alto Tocantins e alto rio Paraná. Nessa região, existem charcos de altitude envolvendo drenagens dos sistemas hidrográficos do Tocantins, alto Paraná e São Francisco, assim como observado na Estação Ecológica Águas Emendadas no extremo nordeste do Distrito Federal. *Hoplias malabaricus* é uma espécie típica de regiões pantanosas, tolerante a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água, o que pode facilitar seu deslocamento em charcos de altitudes entre bacias (Santos *et al.* 2009).

O Plioceno é a época indicada para o início de divergência molecular entre as populações com cariomorfo $2n=39/40D$, restritas ao alto rio Paraná, e $2n=40C$, amplamente distribuídas nos sistemas hidrográficos do rio Paraguai, baixo rio Paraná e Uruguai (Bertollo *et al.*, 2000; Pazza & Julio Jr, 2003). O alto e baixo rio Paraná eram limitados até 1982 pelo Salto de Sete Quedas, na divisa do Brasil com a Argentina, o qual era uma eficiente barreira à dispersão e ao fluxo gênico entre a ictiofauna do baixo e alto rio Paraná (Bonetto, 1986). Com a inundação de Sete Quedas, devido à construção do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu, a 150 km abaixo do salto, as populações com cariomorfo $2n=40C$ dispersaram para o alto rio Paraná (Pazza & Julio Jr, 2003). O cânion e o salto de Sete Quedas foram escavados sobre rochas basálticas da Formação Serra Geral desde o Plioceno (Maack, 1968). A época proposta para a cladogênese entre as populações $2n=40C$ Paraguai/Uruguai e $2n=39/40D$ do alto rio Paraná é congruente com o período de formação do cânion e salto de Sete Quedas. As semelhanças na estrutura cariotípica e nas hibridizações *in situ* de sequências de DNA repetitivos também corroboram a hipótese de que o cariomorfo $2n=39/40C$ é derivado de populações $2n=40C$ amplamente distribuídas no baixo rio Paraná e no rio Paraguai. Todos os trabalhos

citogenéticos com sondas de DNA repetitivo, ou bandeamentos cromossômicos, buscando estabelecer as relações evolutivas entre os cariomorfos $2n=40C$ e $2n=39/40D$ são realizados em espécimes coletados nas bacias hidrográficas do rio Paraguai e Paraná (eg. Cioffi *et al.*, 2009).

5.5 *A distribuição de Hoplias malabaricus no sudeste da América do Sul*

Um vetor de dispersão de *Hoplias malabaricus* a partir da região que compreende as modernas bacias hidrográficas dos rios Paraná e Uruguai para as bacias costeiras do sul, sudeste e leste do Brasil é indicado pelo padrão de variação do gene *ATPase6* e pela distribuição dos cariomorfos. A divergência miocênica entre os haplótipos costeiros de espécimes com o cariomorfo $2n=42A$ e aqueles presentes no baixo rio Paraná/Uruguai indica uma colonização mais antiga das bacias costeiras ao sul da Formação Abrolhos, do que o indicado para as bacias costeiras no nordeste do Brasil. As populações de *H. malabaricus* presentes nas bacias costeiras ao norte da Formação Abrolhos até o Suriname e no rio São Francisco apresentam o cariomorfo $2n=40F$ (Jacobina *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2013). Estes fatores inviabilizam a hipótese de colonização das bacias costeiras do leste por populações de *H. malabaricus* vindas do nordeste ou do rio São Francisco. A estruturação da rede de haplótipos demonstra um padrão de divergência haplotípica nas bacias costeiras do leste, sudeste e sul do Brasil correlacionado com a distância geográfica a partir do sub-haplogrupo sul. Isto sugere um sentido de colonização das populações de *H. malabaricus* a partir de tributários do Paraná para as bacias costeiras do sul, sudeste e leste do Brasil, durante o Mioceno médio-superior. A época indicada para a colonização das bacias costeiras ocidentais ao sul do Banco de

Abrolhos é consideravelmente mais antiga que a idade estimada para o estabelecimento da moderna bacia hidrográfica do rio Uruguai. Com base em evidências circunstanciais, alguns autores sugerem que o rio Uruguai tenha se formado a partir do Plioceno (Maack 1968; Bossi 1969). Aparentemente, durante o Mioceno não existiam eficientes barreiras à dispersão de *H. malabaricus* entre o baixo e alto rio Paraná, como as corredeiras e o Salto de Sete Quedas (revisado em Maack, 1968).

A ausência de haplótipos do sub-haplogrupo sul no alto rio Paraná pode ser decorrente de extinções locais de haplótipos desse sub-haplogrupo, de efeito de amostragem e de recorrentes dispersões de *Hoplias malabaricus* das bacias hidrográficas vizinhas para as drenagens do alto rio Paraná, a partir do Plioceno. A bacia hidrográfica do alto rio Paraná possui grandes extensões de divisores de águas com grandes bacias hidrográficas, tais como: Amazonas, São Francisco, Paraguai e com as bacias costeiras do leste do Brasil. As redes de haplótipos com os haplogrupos III, IV e V demonstram um claro padrão de expansão a partir das drenagens vizinhas para o alto rio Paraná. Este constante influxo de haplótipos de traíras com o cariomorfo $2n=42A$, nessa região, possivelmente dificulta a coleta de haplótipos do sub-haplogrupo sul. Capturas de cabeceiras entre tributários do alto rio Paraná e drenagens vizinhas são atribuídas como responsáveis pela semelhança da ictiofauna do alto rio Paraná com as bacias hidrográficas vizinhas (Pavanelli & Britski, 1999; Ribeiro, 2006; Menezes, *et al.*, 2008; Buckup, 2011).

Os haplótipos coletados no alto rio Paraná que são derivados dos sub-haplogrupos leste B e sudeste refletem recentes eventos de dispersões a partir da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul. Aparentemente, o rio Paraíba do Sul funcionou como um “corredor de dispersão” entre as bacias costeiras e drenagens do

alto rio Paraná. Atualmente, o rio Paraíba do Sul atravessa o Lineamento Magmático de Cabo Frio (Riccomini *et al.*, 2005), o qual limita os setores geomorfológicos costeiros do leste e sudeste (Villwock *et al.*, 2005) e os sub-haplogrupos leste B e sudeste (Pereira *et al.*, 2013). A região envolvendo os divisores de águas do rio Paraíba do Sul e alto Paraná possui uma complexa história paleohidrológica de capturas de cabeceiras que provavelmente levaram à ictiofauna semelhante entre essas bacias (Ribeiro, 2006; Menezes *et al.*, 2008; Buckup, 2011). Nessa região, a falha de Além Paraíba determina a formação de vales lineares e assimétricos principalmente no vale do rio Paraíba do Sul e também controla o contato entre as regiões geomorfológicas da Serra da Mantiqueira e os tabuleiros costeiros no estado do Espírito Santo. Os movimentos mais recentes dessa falha continental são reconhecidos no início do Pleistoceno (1,6 Ma), e durante o Holoceno (Saadi, 2002). A coalescência entre os haplótipos do alto rio Paraná e São Francisco, presentes nos sub-haplogrupos leste B e sudeste, com os haplótipos costeiros, corresponde a um período do Pleistoceno inferior ao presente. Estes dados são consistentes com o “padrão C” hipotetizado por Ribeiro (2006) que inclui recentes capturas de cabeceira entre rios costeiros e drenagens continentais, presentes no Escudo Cristalino Brasileiro. A presença de populações com o cariomorfo $2n=42A$ no limite biogeográfico do alto rio São Francisco (bacia do rio Pará) também é atribuída a capturas de cabeceira de tributários no alto rio Grande (Santos *et al.*, 2009). Nesta região existe a falha Descontinuidade Crustal do alto rio Grande, com movimentos leste-oeste durante o Holoceno (Saadi, 2002).

A bacia hidrográfica do rio São Francisco possui uma pequena extensão de divisores de águas próximos à bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, restritos apenas a confluência da Serra da Mantiqueira e Espinhaço, duas importantes

barreiras à dispersão da ictiofauna (Ingenito & Buckup, 2007; Ribeiro, 2006). É pouco provável a dispersão de populações de *H. malabaricus* com haplótipos dos sub-haplogrupos costeiros diretamente para o rio São Francisco. O sub-haplogrupo leste A, por exemplo, formado por haplótipos coletados na bacia hidrográfica do rio Doce e costeiras relacionadas é limitado ao oeste pela Serra do Espinhaço e possui a distribuição limitada por esta formação geológica.

A coalescência no início do Pleistoceno entre os haplótipos presentes nos três sub-haplogrupos costeiros é consistente com a hipótese de confluência de grupos de bacias costeiras em paleo-canais durante períodos glaciais. Os sub-haplogrupos costeiros ao sul da Formação Abrolhos são coincidentes com os setores geomorfológicos propostos por Cruz (1985) para dividir a costa do Brasil. Isto sugere que a evolução das populações de *Hoplias malabaricus* presentes nas bacias costeiras foram direcionadas por processos paleohidrológicos, tais como: atividades tectônicas, oceanográficas e eventos paleoclimáticos que determinaram as feições fisiográficas destes setores (Pereira *et al.*, 2013). Os espécimes com haplótipos presentes no sub-haplogrupo leste A foram coletados ao norte da foz do rio Doce, uma área de deltas, falésias e recifes de arenito. O sub-haplogrupo leste B apresentou haplótipos de espécimes coletados nas bacias costeiras do rio Paraíba do Sul até o Lineamento Magmático de Cabo Frio, uma região caracterizada por costões rochosos, lagunas e manguezais. O sub-haplogrupo sudeste apresentou haplótipos de espécimes coletados em bacias costeiras ao sul de Cabo Frio, compreendendo os setores geomorfológicos do sudeste e sul propostos por Cruz (1985). O setor sudeste, que é limitado ao norte por Cabo Frio e ao sul pelo Cabo de Santa Marta, é caracterizado por uma região isolada pela Serra do Mar onde há predominância de costões rochosos de embasamento granito-gnaiss, laguna/barrera e manguezais.

Abaixo do Cabo de Santa Marta, até o Arroyo Chuí (RS), a linha da costa é caracterizada por planícies com múltiplas barreiras arenosas e sistemas lagunares (Cruz, 1985; Villwock *et al.*, 2005).

As populações costeiras de *Hoplias malabaricus* com haplótipos no sub-haplogrupo leste A ocorrem ao sul da Formação Abrolhos, a qual tem funcionado como uma barreira física à dispersão das populações de *H. malabaricus* entre as bacias costeiras do nordeste e leste, em períodos de máximos glaciais (Pereira *et al.*, 2013). A Formação Abrolhos é um notável alargamento da plataforma continental, que forma duas saliências costeiras submersas entre 17° e 20°S, decorrente do desenvolvimento de banco de corais e rochas sedimentares sobre substrato vulcânico (Guazelli & Carvalho, 1981). Este alargamento coberto por corais também é denominado Banco de Abrolhos e tem idade estimada de 59 - 37 milhões de anos (Eoceno). Levantamentos batimétricos ao norte da foz do rio Doce demonstram a presença de canais convergindo para a depressão de Abrolhos. Hoje estas depressões são representadas por isóbatas de 60 metros cercadas por altas topografias que atingem isóbatas de 30 metros (Kowsmann & Costa, 1979). Estes canais pleistocênicos são delimitados ao sul pela foz do rio Doce e ao norte pela Formação Abrolhos e provavelmente permitiram intensa dispersão de *H. malabaricus*, como sugerido pela pequena distância genética entre as populações presentes no sub-haplogrupo leste A. Não existem evidências de paleo-canais envolvendo as drenagens do rio Doce e Paraíba do Sul e a coalescência indicada entre os haplótipos *ATPase6* de *H. malabaricus*, coletados nestes sistemas hidrográficos, é o início do Mioceno superior. Capturas de cabeceiras também podem ter ocorrido dentro dos setores geomorfológicos da costa do Brasil contribuindo com os sub-haplogrupos observados (Pereira *et al.*, 2013).

No limite entre os haplogrupos leste B e sudeste encontra-se o Lineamento Magmático de Cabo Frio, o qual provavelmente isolou as populações de *Hoplias malabaricus* das bacias costeiras do leste e sudeste em períodos glaciais. Este lineamento magmático é formado por grupos de rochas alcalinas ígneas do final do Cretáceo e Paleógeno e tem características estruturais desenvolvidas de Jaboticabal (interior do estado de São Paulo) até o limite da crosta continental e oceânica (Riccomini *et al.*, 2005). A divergência molecular encontrada com o gene *ATPase6* entre os sub-haplogrupos leste B e sudeste sugere que o rio Paraíba do Sul transpôs o Lineamento Magmático de Cabo Frio após o o Mioceno superior, pois do contrário, provavelmente não seria observado a estruturação filogeográfica encontrada. A rede de haplótipos com o gene *ATPase6* indica que as populações de *H. malabaricus* costeiras com $2n=42$ cromossomos, ao norte deste lineamento magmático, são mais relacionadas entre si do que com aquelas ao sul desta formação geológica. A história paleohidrológica envolvendo a bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul e drenagens vizinhas é complexa (Ab' Saber 1957; Riccomini, 1990; Saadi, 2002). Esta condição torna frágeis as inferências simplistas sobre a configuração das bacias hidrográficas na região durante o Mioceno. A distribuição dos sub-haplogrupos de *H. malabaricus* é congruente com a hipótese que, durante o Neógeno, movimentos tectônicos relacionados à soleira de Arujá inverteram o curso do rio Paraíba do Sul, o qual era tributário no alto Paraná (Malabarba, 1998). Análises geomorfológicas, estratigráficas e fluvio-morfométricas permitem interpretar que no Mioceno as pressões de compressão levaram o rio Paraíba do Sul a inverter o seu curso para noroeste e, na sequência, para nordeste, configurando o chamado Cotovelo de Guararema (Maciel, 2009). No entanto, não existe uma idade estimada para a transposição do Lineamento Magmático de Cabo Frio pelo rio Paraíba do Sul. O

tempo de divergência molecular indicado pelo gene *ATPase6* e o padrão filogeográfico de *H. malabaricus* sugerem que a partir do Mioceno superior este rio transpôs o Lineamento Magmático de Cabo Frio.

Os padrões de distribuição dos sub-haplogrupos costeiros de *H. malabaricus* com cariomorfo 2n=42A são totalmente congruentes com as regiões de endemismo de peixes propostas por Carvalho (2007) para a costa do Brasil (Pereira *et al.*, 2013). O padrão filogeográfico observado em *Hoplias malabaricus* indica que dois processos moldaram a evolução e diversificação genética das populações costeiras desse táxon e, possivelmente, os padrões de endemismo de outros peixes. O primeiro processo refere-se a variações eustáticas do nível do mar. Durante os períodos glaciais, o baixo nível do mar permitiu a confluência dos rios dentro de seções geomorfológicas da costa brasileira, enquanto a Formação Abrolhos e o Lineamento Magmático de Cabo Frio foram barreiras geográficas entre as populações do nordeste, leste e sudeste. O segundo processo consiste em capturas de cabeceiras envolvendo os sistemas de drenagem costeiros e continentais, ou entre drenagens costeiras dentro de um mesmo setor geomorfológico (Pereira *et al.*, 2013).

5.6 Biogeografia histórica de Hoplias malabaricus na América do Sul

As evidências geomorfológicas, paleohidrológicas, fósseis, moleculares, citogenéticas e filogeográficas indicam o seguinte cenário de diversificação de *Hoplias malabaricus* na América do Sul. O norte/noroeste do continente é o centro de origem deste táxon. No Mioceno inferior, capturas de cabeceiras do paleo-Amazonas-Orinoco para um paleo-Paraná-Paraguai levaram ao aumento de distribuição de *H. malabaricus* para o sul do continente. Neste período, a redução do

número diploide de $2n=42$ para $2n=40$ cromossomos já estava estabelecida. Durante o Mioceno inferior-médio, as populações com $2n=42$ cromossomos colonizaram as bacias costeiras ocidentais ao sul da Formação Abrolhos. A partir do Plioceno, a formação do cânion e salto de Sete Quedas, aparentemente, isolou as populações com $2n=40C$ do baixo rio Paraná daquelas da porção alta da bacia, onde se estabeleceu o derivado cariomorfo $2n=39/40D$. Na bacia hidrográfica amazônica, durante o Plioceno inferior, possivelmente ocorreu uma segunda redução no número diploide em *H. malabaricus*. Nesta época existiu um haplótipo coalescente entre os cariomorfos $2n=40C$ amazônicos e $2n=40F$. A partir do Plioceno, as populações com o cariomorfo $2n=40F$ estabeleceram-se nos rios São Francisco, Paraíba e nas bacias costeiras do nordeste do Brasil, com o limite sul sendo a Formação Abrolhos. O Pleistoceno foi uma época marcada por grandes glaciações, as quais levaram à diminuição do nível do mar, à formação de paleo-canais de água doce na linha da costa e conseqüente aumento do fluxo gênico entre populações de *H. malabaricus*, as quais hoje se encontram em bacias costeiras isoladas. A partir do Pleistoceno, aparentemente, a bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul funcionou como um “corredor de dispersão” para o alto Paraná de populações de *H. malabaricus* que estavam isoladas nas bacias costeiras desde o Mioceno. Eventos locais de dispersão foram observados desde o Plioceno em populações de *H. malabaricus* presentes em divisores de águas de baixas altitudes e em regiões que hoje são planaltos pantanosos que limitam as bacias hidrográficas.

Em síntese, os resultados indicam que a evolução e diversificação das populações de *Hoplias malabaricus* e, possivelmente, de outras espécies de peixes dulcícolas da América do Sul são decorrentes de três principais fatores. O primeiro são implicações do soerguimento dos Andes, as quais determinaram importantes

mudanças paleohidrológicas e conseqüentemente no padrão de distribuição das populações deste táxon em todo o continente. O segundo envolve dinâmicas locais de capturas de cabeceiras decorrentes de reativação de falhas geológicas ou processos erosivos diferenciais, os quais levam a algumas drenagens a apresentarem um mosaico de linhagens genealógicas que diferenciaram nas bacias vizinhas (ex. alto Paraná). O terceiro fator envolve as dinâmicas glaciais e alterações eustáticas no nível do mar, que levaram à confluência e posterior separação de grupos de drenagens costeiras, em setores geomorfológicos bem definidos, e conseqüentemente a uma pequena distância genética entre populações hoje isoladas.

5.7 Elevada distância genética entre haplótipos mitocondriais não reflete isolamento reprodutivo em Hoplias malabaricus

As populações com o cariomorfo $2n=40C$ das bacias hidrográficas do rio Paraguai e Uruguai não formaram um clado com as populações $2n=40C$ amazônicas com base no padrão de variação do gene *ATPase6*. Isto indica que a classificação dos cariomorfos proposta por Bertollo e colaboradores (2000) não gera grupos monofiléticos, ou o diferente número diploide não é uma barreira ao fluxo gênico em *Hoplias malabaricus*. As relações filogenéticas entre as populações deste táxon são congruente com a história paleohidrológica das bacias estudadas, independente do número diploide. Descartando a hipótese de fluxo gênico entre espécimes com diferentes números diploides, devido a ausência de cariomorfos híbridos (Bertollo *et al.*, 2000), provavelmente ocorreram reduções independentes no número diploide de $2n=42$ para $2n=40$ cromossomos em *H. malabaricus*. Contudo, se a redução do

número diploide ocorreu duas vezes, os rearranjos cromossômicos gerados aparentemente não impedem o fluxo gênico entre as populações 2n=40C amazônicas daquelas com o mesmo cariomorfo da bacia hidrográfica dos rios Paraguai, Uruguai e Paraná. A correlação entre os dados citogenéticos e moleculares no contexto geográfico permite interpretar que a distância genética observada no DNA mitocondrial *ATPase6* e COI (Marques *et al.*, 2013) refletem o isolamento geográfico entre as populações de *H. malabaricus* das bacias hidrográficas dos rios Paraguai e Amazonas e não o isolamento reprodutivo.

É possível observar na rede de haplótipos com o gene *RAG2* que embora os espécimes com o cariomorfo 2n=42A e haplótipo mitocondrial no haplogrupo III possuam um haplótipo coalescente com os espécimes com 2n=40 cromossomos no Mioceno superior, eles formam um clado bem definido com os haplótipos *RAG2* de outros espécimes com 2n=42 cromossomos. Da mesma forma, os espécimes com o cariomorfo 2n=40C amazônicos e dos rios Paraguai/Uruguai, os quais possuem um haplótipo coalescente no Mioceno inferior, também formam um haplogrupo com o gene *RAG2*. Esta estruturação dos haplótipos *RAG2* foi interpretada como decorrente de fluxo gênico entre espécimes com o cariomorfo 2n=40C das linhagens amazônicas e do rio Paraguai. A rede de haplótipos *RAG2* dos espécimes com o cariomorfo 2n=40C possui uma forte correlação geográfica, exceto nas amostras coletadas próximo aos divisores de águas entre as bacias hidrográficas do alto Juruena (Amazonas) e Paraguai. A presença de espécimes com o mesmo haplótipo *RAG2* nas bacias hidrográficas dos rios Juruena e Paraguai, e com haplótipos mitocondriais característicos das populações da bacia de coleta, é outra evidência de fluxo gênico entre populações com o cariomorfo 2n=40C e elevada distância genética do DNA mitocondrial. Assumindo a hipótese de fluxo gênico, espera-se

encontrar uma maior diversidade de alelos *RAG2*, em decorrência da recombinação dos alelos nucleares destas linhagens inicialmente isoladas no Mioceno. De fato, nos trinta e sete espécimes coletados nos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, que apresentavam os haplótipos mitocondriais no haplogrupo IV, foram identificados 20 haplótipos *RAG2*, aproximadamente um novo haplótipo encontrado a cada duas amostras sequenciadas. Para efeito de comparação, os trinta espécimes distribuídos nos quatro sub-haplogrupos do haplogrupo mitocondrial V apresentaram seis haplótipos *RAG2*.

5.8 *As relações filogeográficas entre as populações de Hoplias malabaricus refletem as relações de similaridade entre as ecorregiões de peixes de água doce da América do Sul*

A estimativa de coalescência das populações de *Hoplias malabaricus* indica que este táxon existe desde o Oligoceno inferior e os principais eventos paleohidrológicos que determinaram a área de distribuição das modernas espécies de peixes neotropicais também ocorreram a partir desta época. Alberts e Carvalho (2011) elaboraram uma *Brooks Parsimony Analysis* (BPA) para estabelecer a importância dos processos paleohidrográficos na relação de similaridade da ictiofauna entre as ecorregiões de peixes de água doce da América do Sul. As análises foram realizadas com 333 espécies de peixes de 15 famílias e seis ordens, distribuídas em 43 ecorregiões de peixes propostas por Abell *et al.*, (2008). O cladograma de área, estimado a partir da composição da ictiofauna e das relações filogenéticas entre as espécies de peixes, é consistente com as relações de comum história paleohidrológica entre as modernas drenagens neotropicais e é uma

topologia muito semelhante com a hipótese filogeográfica proposta para *H. malabaricus*. As datações paleogeográficas utilizadas na BPA indicam que os eventos cladogenéticos que levaram a diversidade cladal observada no cladograma de área iniciaram-se antes de 33 Ma e a diversificação das modernas espécies de peixes de água doce neotropicais ocorreu de 30 - 3 Ma (Albert & Carvalho, 2011). Estes autores também fizeram uma *Parsimony Analysis of Endemicity* (PAE), onde foi elaborado um cladograma de área considerando apenas a distribuição das espécies de peixes. Esta análise permitiu verificar as relações recentes de dispersão entre as ecorregiões estudadas. A BPA e PAE recuperaram uma topologia muito similar e a análise conjunta destes dois métodos analíticos permitiu reconhecer que a diversificação da ictiofauna neotropical foi determinada pela combinação de eventos vicariantes e de dispersão (Albert & Carvalho, 2011). Em *Hoplias malabaricus*, as inferências filogeográficas também permitiram reconhecer a igual importância da vicariância e dispersão na evolução deste táxon.

O cladograma representando as relações genealógicas entre as populações de *Hoplias malabaricus* das bacias hidrográficas dos rios Magdalena, Orinoco, Paraguai e porções baixas da bacia amazônica é muito semelhante ao cladograma de similaridade de ecorregiões gerado com a BPA: (bacias trans-andíneas (bacia hidrográficas do rio da Prata (bacias costeiras atlânticas (alto Madeira (Orinoco, Amazonas)))))) (Albert & Carvalho, 2011). Contudo, nesta análise de BPA as bacias costeiras atlânticas ao norte do rio Doce até a foz do rio São Francisco foram consideradas uma mesma ecorregião, o que pode ter levado a maior proximidade da bacia hidrográfica do rio São Francisco e costeiras do nordeste do Brasil com as bacias costeiras atlânticas ao sul da Formação Abrolhos. Em *H. malabaricus*, as bacias costeiras ao norte da Formação Abrolhos possuem populações muito

aparentadas com a bacia hidrográfica do rio São Francisco, enquanto as bacias costeiras ao sul desta formação possuem populações mais aparentadas com a bacia hidrográfica do rio da Prata.

As análises filogeográficas em *Hoplias malabaricus* permitem reconhecer que os eventos de vicariância e dispersão que determinaram a distribuição das espécies de peixes dulcícolas neotropicais refletem-se na genealogia mitocondrial deste antigo táxon. Aparentemente, os processos paleohidrológicos que contribuíram com a distribuição e diversificação da ictiofauna da América do Sul levaram à diversidade cariotípica e a ampla distribuição de *H. malabaricus*.

6. REFERÊNCIAS

Ab'Saber, A.N. (1957) O problema das conexões antigas e da separação da drenagem do Paraíba e Tietê. *Boletim Paulista de Geografia*, **26**, 38-49.

Ab'Saber, A.N. (1998) Megageomorfologia do território brasileiro. *Geomorfologia do Brasil* (ed. por S.B. Cunha & A.J.T. Guerra), pp. p. 71-106. Bertrand Press, Rio de Janeiro, Brasil.

Albert, J.S. & Carvalho, T.P. (2011) Neogene assembly of modern faunas. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp. 119-136. University of California Press, Berkeley, EUA.

Albert, J.S. Petry, P. & Reis, R.E. (2011) Major biogeographic and phylogenetic patterns. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp. 21-58. University of California Press, Berkeley, EUA.

- Albert, J.S. & Reis, R.E. (2011) Introduction to Neotropical freshwaters. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp.3-19. University of California Press, Berkeley, EUA.
- Beheregaray, L.B.P., Sunnucks, D.A. & Briscoe, D.A. (2002) 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: Biological Sciences*, **269**, 65-73.
- Bertollo, L.A.C., Born, G.G., Dergam, J.A., Fenocchio, A.S. & Moreira-Filho, O. (2000) A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of karyomorphs and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, **8**, 603-613.
- Beurlen, K. (1970) *Geologie Von Brasilien*. Borntraeger, Berlin, Alemanha.
- Bizerril, C.R.S.F. (1994) Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste do Brasil. *Acta Biologica Leopoldensia*, **16**, 51-80.
- Bossi, J. (1969) *Geologia Del Uruguay*. Universidad de La Republica, Montevideo, Uruguai.
- Bonetto, A.A. (1986) The Paraná River System. The ecology of river systems (ed. por B.R. Davis & K.F. Walker), pp. 541-546. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Boyce, T.M., Zwick, M.E. & Aquadro, C. F. (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, **123**, 825-836.

- Bloom, D.D. & Lovejoy, N.R. (2011) The biogeography of marine incursions in South America. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp. 137-144. University of California Press, Berkeley, EUA.
- Buckup, P.A. (2011) The Eastern Brazilian Shield. *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis). University of California Press, Berkeley, EUA.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A. & DeSalle, R. (2005) Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**, 135-153.
- Carvalho, T.P. (2007) Distributional patterns of freshwater fishes in coastal Atlantic drainages of eastern Brazil: a preliminary study applying parsimony analysis of endemism. *Darwiniana*, **45**, 65-67.
- Charrier, R., Farías, M. & Maksaev, V. (2009) Evolución Tectónica, Paleogeográfica y metalogénica durante El cenozoico em los Andes de Chile norte y central e implicaciones para lãs regiones adyacentes de Bolivia y Argentina. *Revista de La Asociación Geológica Argentina*, **65**, 5-35.
- Cioffi, M.B., Martins, C. & Bertollo, L.A.C. (2009) Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*, *BMC Genetics*, doi:10.1186/1471-2156-10-34.
- Corrêa, L.L., Karling, L.C., Takemoto, R.M., Ceccarelli, P.S. & Ueta, M.T. (2013) Hematological alterations caused by high intensity of L3 larvae of *Contracaecum* sp Railliet & Henry, 1912 (Nematoda, Anisakidae) in the

- stomach of *Hoplias malabaricus* in lakes in Pirassununga, São Paulo. *Parasitology Research*, DOI 10.1007/s00436-013-3446-8.
- Cruz, O., Coutinho, P.N., Duarte, G.M. & Gomes, A.M.B. (1985) Brazil. *The world's coastline* (ed. por E.C.F. Bird & M.L. Schwartz). Van Nostrand Reinhold Company, New York, EUA.
- Dergam, J.A. (1996) *Phylogeography and character congruence within the Hoplias malabaricus Bloch, 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysi) species complex*. PhD tese. Colorado State University, Colorado, EUA.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214-221.
- Eigenmann, C.H. (1909) The fresh water fishes of Patagonia and an examination of the Archiplata-Archhelenis theory. Reports of The Princeton University Expeditions to Patagonia 1896-1899 (ed. por W.B. Scott), pp. 225-374. E. Schweizerbart, Stuttgart, Alemanha.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
- Gayet, M. (1991) Holostean and Teleostean fishes from Bolivia. *Revista Técnica de Yacimientos petrolíferos fiscales bolivianos, fosiles y fácies de Bolivia*, **1**, 453-494.
- Gayet, M. & Meunier, F. (1998) Maastrichtian to Early Late Paleocene Freshwater Osteichthyes of Bolivia: Additions and Comments. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (ed. por L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P.

Vari, Z.M.S. Lucena, & C.A.S Lucena), pp. 85-110. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.

Grassi, D.J. (2005) *Análisis citogenéticos de poblaciones de Hoplias malabaricus (Teleostei, Eryhrinidae) em las nacientes Del rio Ctalamochita (Valle de Calamuchita, Provincia de Córdoba)*. Trabalho de conclusão de curso, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Posadas, Argentina.

Guazelli, W. & Carvalho, J.C. (1981) Estruturas da margem continental leste brasileira e das áreas oceânicas e continentais adjacentes. *Estruturas e tectonismo da margem continental brasileira, e suas implicações nos processos sedimentares e na avaliação do potencial de recursos minerais* (ed. por L.A.M. Mello), pp. 117-143. Petrobrás, Rio de Janeiro, Brasil.

Haseman, J.D. (1912) Some factors of geographical distribution in South America. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **22**, 9-112.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.

Hoorn, C. (1994) An environmental reconstruction of the palaeo-Amazon river system (Middle to Late Miocene, northwestern Amazonia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, and Palaeoecology*, **112**, 187-238.

- Hoorn, C., Guerrero, J., Lorente, M.A. (1995) Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology*, **23**, 237-240.
- Hubert, N., Duponchelle, F., Nuñez, J., Garcia-Davila, C., Paugy, D. & Renno, J.F. (2007). Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: Implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, **16**, 2115-2136.
- Ihering, H.V. (1891) On the ancient relations between New Zealand and South America. *Transactions and Proceedings of the New Zealand Institute*, **24**, 431-445.
- Ingenito, L.F.S. & P.A. Buckup (2007) The Serra da Mantiqueira as a biogeographic barrier for fishes, southeastern Brazil. *Journal of Biogeography*, **34**, 1173-1182.
- Jacobina, U.P., Affonso, P.R.A.M., Carneiro, P.L.S. & Dergam, J.A. (2009) Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **7**, 617-622.
- Kass, R.E. & Raftery, A.E. (1995) Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association*, **90**, 773-795.
- Kowsmann, R.O. & Costa, M.P.A. (1979) Sedimentação quaternária da margem continental brasileira e das áreas oceânicas adjacentes. Petrobrás, Rio de Janeiro, Brasil.

- Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Lima, C.B. (2008) *Variação citogenética em Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) nos limites das bacias alto Paraguai e amazonica*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Brasil.
- Lima, F.C.T., Ribeiro, A.C. (2001) Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp.145-164. University of California Press, Berkeley, EUA.
- Lundberg, J.G. (1997) Freshwater fishes and their paleobiotic implications. *Vertebrate Paleontology in the Neotropics. The Miocene fauna of La Venta, Colombia* (ed. por R.F. Kay, R.H. Madden, R.L. Cifelli & J.J. Flynn), pp. 68-91. Smithsonian Institution Press. Washington, EUA.
- Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Guerrero, Horton J.B., Malabarba, M.C.S.L. & Wesselingh, F. (1998) The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (ed. por L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena, & C.A.S. Lucena), pp. 13-48. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Maack, R. (1968) *Geografia física do Paraná*. Secretaria da Cultura e do Esporte do Governo do Estado do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Maciel, D.L.P. (2009) *Aplicação de parâmetros morfométricos de elementos de drenagem para a caracterização da soleira de Arujá e a análise de processos*

- neotectônicos*. Dissertação de mestrado, Universidade de Guarulhos, Guarulhos, Brasil.
- Malabarba, M.C.S.L. (1998) Phylogeny of Fossil Characiformes and Paleobiogeography of the Tremembé Formation, São Paulo, Brazil. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (ed. por L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena, & C.A.S Lucena), pp. 69-84. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Marques, D.F., Santos, F.A., Silva, S.S., Sampaio, I.S. & Rodrigues, L.R.R. (2013) Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. *Neotropical Ichthyology*, **11**, 459-466.
- Menezes, N.A., Ribeiro, A.C., Weitzman, S.H. & Torres, R.A. (2008) Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. *Zootaxa*, **1726**, 33-48.
- Monteiro, D.A., Rantin, F.T. & Kalinin, A.L. (2013) Dietary intake of inorganic mercury: bioaccumulation and oxidative stress parameters in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*, *Ecotoxicology*, **22**, 446-456.
- Myers, G.S. (1938) Fresh-water fishes and West Indian zoogeography. *Annual Report of the Smithsonian Institute*, **1937**, 339-364.
- Nelson, G. & Platnick, N.I. (1981) *Systematics and biogeography: cladistics and vicariance*. Columbia University Press, New York, EUA.

- Nylander, J.A.A. (2004) *MrModeltest v2*. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden. Available at <http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>.
- Olson, D., Dinerstein, E., Canevari, P., *et al.*, (1998). *Freshwater biodiversity of Latin America and the Caribbean: a conservation assessment*. Biodiversity Support Program, Washington DC, EUA.
- Oyakawa, O.T. (2003) Family Erythrinidae. *Check list of the freshwater fishes of South America* (ed. por R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr), pp. 238-240. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Pavanelli, C.S. & Britski, H.A. (1999) Description of a new species of *Steindachnerina* (Teleostei: Characiformes: Curimatidae) from the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, **10**, 211-216.
- Pazza, R. & Julio, Jr.H.F. (2003) Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in the upper Paraná river foodplain (Brazil). *Cytologia*, **68**, 159-163.
- Pereira, T.L., Santos, U., Schaefer, C.E., Souza, G.O., Paiva, S.R., Malabarba, L.R., Schmidt, E.E. & Dergam, J.A. (2013) Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *Journal of Biogeography*, **40**, 905-914.
- Quenouille, B., Bermingham, E. & Planes, S. (2004) Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **31**, 66-88.

- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2009) *Tracer v1.5.0*
<<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.
- Reis, R.E. (2013) Conserving the freshwater fishes of South America. *International Zoo Yearbook*, **47**, 1-6.
- Ribeiro, A.C. (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, **4**, 225-246.
- Roberts, T.R. (1975) Characoid fishes from Miocene deposits in the Cuenca basin, Ecuador. *Journal of Zoology*, **175**, 259-271.
- Rosa, R.S., Menezes, N.A., Britski, H.A., Costa, W.J.E.M. & Groth, F. (2004) Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da caatinga. *Ecologia e conservação da Caatinga* (ed. por I.R.M. Tabarelli & J.M.C. da Silva), pp. 135-180. Recife, Edufpe, Brasil.
- Riccomini, C. (1990) *O rift continental do sudeste do Brasil*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Geociências, São Paulo, Brasil.
- Riccomini, C., Velázquez, V.F. & Gomes, C.B. (2005) Tectonic controls of the Mesozoic and Cenozoic alkaline magmatism in central-southeastern Brazilian Platform. *Mesozoic to Cenozoic alkaline magmatism in the Brazilian Platform* (ed. por C.B. Gomes & P. Comin-Chiaramonti), pp. 31-55. EDUSP-FAPESP, São Paulo, Brasil.
- Saadi, A. (1995) A geomorfologia da Serra do Espinhaço em Minas Gerais e suas margens. *Geonomos*, **3**, 41-63.

- Saadi, A., Machette, M.N., Haller, K.M., Dart, R.L., Bradley, L. & Souza, A.M.P.D. (2002) *Map and database of Quaternary faults and lineaments in Brazil*. U.S. Geological Survey, Reston, VA. Available at: <http://pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-230>.
- Sampaio, W.M.S. (2011) *Estudos citogenéticos em Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) na região da Serra dos Carajás, nas bacias hidrográficas do Tocantins-Araguaia e do Xingu*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Santos, U., Völcker, C.M., Belei, F.A., Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Paiva, S.R. & Dergam, J.A. (2009) Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, **75**, 2326-2343.
- Schaefer, S.A. (1998) Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes* (ed. por L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena), pp. 375-400. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Sempere, T., Herail G., Oller, J., & Bohnomme, M. (1990) Late Oligocene-Early Miocene major tectonic crisis and related basin in Bolivia. *Geology*, **18**, 946-949.
- Sites, J.W. & Moritz. (1987) Chromosomal evolution and speciation revisited. *Systematic Zoology*, **36**, 153-174.

- Swofford, D.L. (2002) *PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, EUA.
- Tamura, K.P.D., Peterson, N.S.G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.
- Uba, C.E., Heubeck, C. & Hulka, C. (2006) Evolution of the late Cenozoic Chaco foreland basin, Southern Bolivia. *Basin Research*, **18**, 145-170.
- Vari, R.P. (1988) The Curimatidae, a lowland neotropical fish family (Pisces: Characiformes): distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. *Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (ed. por P.E. Vanzolini & W.R. Heyer), pp. 313-348. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Brasil.
- Vari, R.P. & Malabarba, L.R. (1998) Neotropical ichthyology: An overview. *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes* (ed. por L.R. Malabarba, R. E. Reis, R. Vari, Z.M.S. Lucena, & C.A.S. Lucena), pp. 1-11. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Villwock, J.A., Lessa, G.C., Suguio, K., Ângulo, R.J. & Dillenburg, S.R. (2005) Geologia e geomorfologia de regiões costeiras. *Quaternário do Brasil* (ed. por C.R.G. Souza, K. Suguio, M.A.S. Oliveira & P.E. Oliveira), pp. 94-113. Holos, Ribeirão Preto, Brasil.
- Weitzman, S.H., Menezes, N.A. & Weitzman, M.J. (1988) Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae)

with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. *Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (ed. por P.E. Vanzolini & W.R. Heyer), 379-427. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Brasil.

Wesselingh, F.P. & Hoorn, C. (2011) Geological Development of Amazon and Orinoco Basins. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes* (ed. por J.S. Albert & R.E. Reis), pp. 59-67. University of California Press, Berkeley, EUA.

Wilcox, T.P., Zwickl, D.J., Heath, T.A. & Hillis, D.M. (2002) Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**, 361-371.

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

CONCLUSÕES GERAIS

As evidências geomorfológicas, paleohidrológicas, fósseis, moleculares, citogenéticas e filogeográficas indicam o seguinte cenário de diversificação de *Hoplias malabaricus* na América do Sul. Provavelmente, o norte/noroeste do continente é o centro de origem deste táxon. No Mioceno inferior, capturas de cabeceiras do paleo-Amazonas-Orinoco para um paleo-Paraná-Paraguai levaram ao

aumento de distribuição de *H. malabaricus* para o sul do continente. Neste período a redução do número diploide de $2n=42$ para o $2n=40$ cromossomos já estava estabelecida. Durante o Mioceno inferior-médio, as populações com $2n=42$ cromossomos colonizaram as bacias costeiras ocidentais ao sul da Formação Abrolhos. A partir do Plioceno, a formação do cânion e salto de Sete Quedas, aparentemente, isolou as populações com $2n=40C$ do baixo rio Paraná daquelas da porção alta da bacia onde se estabeleceu o derivado cariomorfo $2n=39/40D$. Na bacia hidrográfica amazônica, a topologia indicada pelo gene *ATPase6* sugere dois cenários alternativos: uma segunda redução no número diploide em *H. malabaricus* de $2n=42$ para $2n=40$ cromossomos durante o Plioceno inferior, ou fluxo gênico entre espécimes que possuem o número diploide diferente. No Plioceno também existiu um haplótipo coalescente entre os cariomorfos $2n=40C$ amazônicos e $2n=40F$. A partir do Plioceno, as populações com o cariomorfo $2n=40F$ estabeleceram-se nos rios São Francisco, Parnaíba e bacias costeiras do nordeste ao norte da Formação Abrolhos. O Pleistoceno foi uma época marcada por grandes glaciações, as quais levaram à diminuição do nível do mar, à formação de paleocanais de água doce na linha da costa e conseqüente aumento do fluxo gênico entre populações de *H. malabaricus*, as quais hoje se encontram em bacias costeiras isoladas. A partir do Pleistoceno, aparentemente, a bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul funcionou como um “corredor de dispersão” para o alto rio Paraná de traíras com haplótipos que se diferenciaram nas populações de *H. malabaricus* que estavam isoladas nas bacias costeiras desde o Mioceno. Eventos locais de dispersão foram observados desde o Plioceno em populações de *H. malabaricus* presentes em divisores de águas de baixas altitudes e em regiões que hoje correspondem a planaltos pantanosos que limitam as bacias hidrográficas.

Em síntese, os resultados indicam que a evolução e diversificação das populações de *Hoplias malabaricus* e, possivelmente de outras espécies de peixes dulcícolas da América do Sul, são decorrentes de três principais fatores. O primeiro são implicações do soerguimento dos Andes, as quais determinaram importantes mudanças paleohidrológicas e conseqüentemente no padrão de distribuição das populações deste táxon em todo o continente. O segundo envolve dinâmicas locais de capturas de cabeceiras decorrentes de reativação de falhas geológicas ou processos erosivos diferenciais, os quais levam a algumas drenagens a apresentarem um mosaico de linhagens genealógicas que diferenciaram nas bacias vizinhas (ex. alto Paraná). O terceiro fator envolve as dinâmicas glaciais, que levaram à confluência e posterior separação de grupos de drenagens costeiras em setores geomorfológicos bem definidos e conseqüentemente a uma pequena distância genética entre populações hoje isoladas.