

This file has been cleaned of potential threats.

If you confirm that the file is coming from a trusted source, you can send the following SHA-256 hash value to your admin for the original file.

c57117d4433b7dfd3260e2ce73c3b65d4c0ab0fd1dcacf367695dddd01678a8

To view the reconstructed contents, please SCROLL DOWN to next page.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA-INPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

Delimitação de espécies-linhagens do gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes:
Pimelodidae) e estimativa da variabilidade genética de *P. punctifer*

ANTONIO SAULO CUNHA MACHADO

Manaus, Amazonas

Abril, 2020

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA-INPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

ANTONIO SAULO CUNHA MACHADO

Delimitação de espécies-linhagens do gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes:
Pimelodidae) e estimativa da variabilidade genética de *P. punctifer*

Tese apresentada aos Programas de Pós-
Graduação do INPA como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Orientadora: Dra. Jacqueline da Silva Batista

Manaus, Amazonas

Abril, 2020



ATA DA DEFESA PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

No dia 02 de Abril de 2020, às 14:00 horas, reuniu-se a Banca Julgadora da **DEFESA PÚBLICA de DOUTORADO**, composta pelos seguintes Doutores (as), membros titulares: Ahana Maitra, Carlos H. dos Anjos dos Santos, Carmem Garcia-Davila, Miriam Silva Rafael e Dannel Rocha Bevilaqua; tendo como membro suplente: Vera Ma. Fonseca Almeida e Val e Valéria Machado, afim de proceder a arguição pública da **TESE** do (a) estudante **ANTONIO SAULO CUNHA MACHADO**, intitulada: **“DELIMITAÇÃO DE ESPECIES-LINHAGENS DO GENERO *Pseudoplatystoma* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE) COM BASE EM MARCADORES DO DNA MITOCONDRIAL E ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *P. punctifer*.”**

O estudo foi conduzido sob a orientação da Dra. Jacqueline da Silva Batista, do INPA.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

☒ Aprovado por unanimidade	☐ Reprovado
☐ Aprovado por maioria	
Menção (se meritório):	
☒ Aprovado com “Distinção” (por maioria)	
☐ Aprovado com “Distinção e Louvor” (por unanimidade)	

Foi lavrada a ata e assinada pelos membros presentes da Banca Julgadora.

Ahana Maitra – INPA

Carlos H. dos Anjos dos Santos – IN

Carmem Garcia-Davila – IIAP

Miriam Silva Rafael – INPA

Dannel Rocha Bevilaqua – IFAM

Dra. Jacqueline da Silva Batista
Coordenadora do PPG GCBEv/INPA
PO. 281/2017 – INPA/MCTIC-PR

Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEv Art. 62 “Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que cumpridas às exigências das Agências de Fomento, dos regulamentos do PPG-INPA e do PPG GCBEv. Para obtenção do título, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 52 ao 55 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 61 e 64 do Regulamento PPG GCBEv.

A635d Machado, Antonio Saulo Cunha
Delimitação de espécies-linhagens do gênero
Pseudoplatystoma (Siluriformes: Pimelodidae) e
estimativa da variabilidade genética de P.
punctifer / Antonio Saulo Cunha Machado;
orientadora Jacqueline da Silva Batista Batista. --
Manaus:[s.l], 2020.
102 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós Graduação em
Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) --
Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2020.

1. DNA mitocondrial. 2. Microsatélites. 3.
Bacia Amazônica. 4. Pseudoplatystoma. 5. Conservação
. I. Batista, Jacqueline da Silva Batista, orient.
II. Título.

CDD: 597.80415

AGRADECIMENTO INSTITUCIONAL

Agradecemos aos financiadores e apoiadores da pesquisa científica, projetos: CNPq/CT-Amazonia 554054/2006-0 e 575603/2008-9, CNPq/BrBol 564953/2010-5, FAPEAM/PPP 3036/2012, FINEP/DARPA e FAPEAM/Pronex. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos. Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv) do Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia (INPA) pela estrutura acadêmica, e por toda infraestrutura do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) onde este estudo foi desenvolvido. Ao suporte técnico do Laboratório de Genética Evolução Animal (LEGAL) da UFAM e ao IBAMA pelas licenças de coleta e transporte do material biológico N°s. 017, 130, 14278-1 e 25890-1.

AGRADECIMENTOS

Ao DIVINO MESTRE que ao longo de minha vida me auxiliou a passar por dificuldades, que serviram para aguçar o autoconhecimento de minhas limitações e reforçar minha fé.

Ao meu pai José Almir e a minha avó Aldenice de Souza, por tudo que fizeram por mim, pelo exemplo de honra, dignidade e honestidade. Por terem me mostrado o caminho da LUZ. E especialmente para minha Mãe Maria da Conceição Cunha Paixão onde quer que esteja.

A minha Orientadora Dra. Jacqueline da Silva Batista por ter acompanhado de perto todo o meu trabalho, pela orientação e contribuição substancial (em vários sentidos), pelos seus conselhos, paciência, amizade e oportunidades.

A MSc. Kyara Formiga que me deu a oportunidade de trabalhar com a biologia molecular e a ingressar na área da pesquisa científica, quando eu ainda estava na graduação, isso em dezembro de 2009, e lá se vão mais de 10 anos.

Ao Dr. Tomas Hrbek e a Dra. Izeni Farias pelas valiosas contribuições durante a fase de interpretação e análise de dados de alguns resultados teste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv) do Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia (INPA), pela oportunidade do aperfeiçoamento.

À contribuição dos doutores avaliadores da qualificação Dr. Fabio Muniz, Dra. Vera Scapassa e Dra. Carlos Edwar, pelas valiosas sugestões, as quais aprimoraram consideravelmente este trabalho.

Um agradecimento especial às pessoas do Projeto Pirada e do LEGAL (Laboratório de Genética Evolução Animal) que fizeram as coletas das amostras de *Pseudoplatystoma* usadas nesse estudo.

A minha AMIGA e mãe de coração Dra. Izaura Bezerra Francini, pessoa de alto nível de bondade e evolução espiritual que me auxiliou em vários sentidos, e contribuiu consideravelmente em muitas das etapas acadêmicas em que tive êxito, sem o seu auxilio com certeza a caminhada seria mais difícil.

Ao amigo Jones Batista pelos conselhos e incentivo para sempre me dedicar aos estudos e pelas boas palavras, e ensinamentos SUPERIORES.

Enfim aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esse momento e esse trabalho se realizassem.

Tudo o homem pode fazer, só depende é de querer.

José Gabriel da Costa

Mestre Gabriel

Resumo

Os grandes bagres do gênero *Pseudoplatystoma* desempenham importante papel como predadores de topo nos ecossistemas de água doce na região neotropical. As espécies desse gênero são importantes recursos pesqueiros e apresentam um elevado valor comercial em sua área de distribuição. Durante muito tempo a riqueza de espécies desse gênero foi negligenciada, onde eram reconhecidas apenas 3 espécies. No entanto, após a revisão morfológica do gênero o número de espécies aumentou para oito. No primeiro de estudo de sistemática molecular o a riqueza de espécies voltou a ser negligenciada, pois foram reconhecidas apenas quatro espécies distintas para o gênero: *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pseudoplatystoma tigrimun* (*sensu lato*) e *Pseudoplatystoma fasciatum* (*sensu lato*). Assim, o primeiro capítulo deste estudo teve como objetivo: Testar os marcadores mitocondriais citocromo oxidase I (COI) e a região controle (RC) como ferramentas de avaliação da diversidade de espécies para o gênero *Pseudoplatystoma* com base nos métodos de delimitação de espécies-linhagens de locus único. O COI não foi eficiente em delimitar as diferentes morfo-espécies, onde foram delimitadas apenas cinco espécies-linhagens. No entanto, a RC com base nos métodos GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent*) e bGMYC (implementação bayesiana do GMYC), delimitaram 9 espécies-linhagens, das 8 morfo-espécies descritas para o gênero *Pseudoplatystoma*, reconhecendo assim a diversidade taxonômica do gênero. Até que estudos de taxonomia integrativa sejam realizados para definição dos status taxonômicos das espécies de *Pseudoplatystoma*, sugerimos que as medidas de conservação (caso necessárias) sejam realizadas de forma independente para essas nove espécies-linhagens identificadas neste estudo. Para o segundo capítulo: Utilizando marcadores microssatélites e mitocondrial (COI), para estimar a diversidade, diferenciação genética e fluxo gênico para *Pseudoplatystoma punctifer*, entre sub-bacias dos rios Madeira e Mamoré/Guaporé. Foi testado se as corredeiras funcionavam como barreiras que limitam o fluxo gênico para esta espécie. Foi identificado três grupos populacionais, um representando os indivíduos da sub-bacia do Mamoré/Guaporé (a montante das corredeiras) e os outros dois representando os indivíduos da sub-bacia do baixo Madeira (a jusante das corredeiras). Alguns fatores podem estar contribuindo para a diferenciação genética observada nas sub-bacias do baixo Madeira e Mamoré/Guaporé. Entre esses fatores, destacamos o isolamento por distância (dado que a espécie é parcialmente migratória), o fluxo gênico restrito e a heterogeneidade hidroquímica e ecológica em toda a área de estudo. Estudos adicionais são claramente necessários para entender o padrão de diferenciação genética associado a diferentes tipos de água para *P. punctifer* na bacia Amazônica. Considerando a importância econômica e ecológica de *P. punctifer*, acreditamos que os resultados deste estudo podem se tornar uma importante contribuição para subsidiar medidas adequadas de conservação e manejo para essas espécies nas sub-bacias da Madeira e Mamoré/Guaporé.

Abstract

The catfishes of the genus *Pseudoplatystoma* play an important role as top predators in freshwater ecosystems in the neotropical region. The species of this genus are important fishing resources and have a high commercial value in their area of distribution. For a long time, the richness of species of this genus was neglected, where only 3 species were recognized. However, after the morphological revision of the genus, the number of species increased to eight. In the first study of molecular systematics, the species richness was again neglected, as only four distinct species were recognized for the genus: *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pseudoplatystoma tigrimun* (sensu lato) and *Pseudoplatystoma fasciatum* (sensu lato). Thus, the first chapter of this study aimed to: Test the mitochondrial markers cytochrome oxidase I (COI) and the control region (RC) as tools to assess species diversity for the genus *Pseudoplatystoma* based on the methods of delimiting species-lineages single locus. The COI was not efficient in delimiting the different morpho-species, where only five species-lineages were delimited. However, the RC based on the GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent) and bGMYC (Bayesian implementation of GMYC) methods, delimited 9 lineage species, of the 8 morpho-species described for the genus *Pseudoplatystoma*, thus recognizing the taxonomic diversity of the genus. Until integrative taxonomy studies are carried out to define the taxonomic status of the species of *Pseudoplatystoma*, we suggest that conservation measures (if necessary) be carried out independently for these nine lineage species identified in this study. For the second chapter: Using microsatellite and mitochondrial (COI) markers, to estimate diversity, genetic differentiation, and gene flow for *Pseudoplatystoma punctifer*, between sub-basins of the Madeira and Mamoré/Guaporé rivers. It was tested whether the rapids functioned as barriers that limit the gene flow for this species. Three population groups were identified, one representing individuals from the Mamoré/Guaporé sub-basin (upstream of the rapids) and the other two representing individuals from the lower Madeira sub-basin (downstream of the rapids). Some factors may be contributing to the genetic differentiation observed in the lower Madeira and Mamoré / Guaporé sub-basins. Among these factors, we highlight the isolation by distance (given that the species is partially migratory), the restricted gene flow, and the hydrochemical and ecological heterogeneity throughout the study area. Additional studies are needed to understand the pattern of genetic differentiation associated with different types of water for *P. punctifer* in the Amazon basin. Considering the economic and ecological importance of *P. punctifer*, we believe that the results of this study can become an important contribution to subsidize adequate conservation and management measures for these species in the sub-basins of Madeira and Mamoré/Guaporé.

Sumário

1. Introdução geral.....	13
2. Justificativas	26
3. Objetivos.....	27
4. Referências bibliográficas	28
Capítulo 1: Delimitação de espécies-linhagens do gênero <i>Pseudoplatystoma</i> (Siluriformes: Pimelodidae) com base em marcadores do DNA mitocondrial	37
Introdução	38
Material e métodos	40
Extração de DNA e amplificação do COI e RC	41
Purificação das PCRs e sequenciamento do DNA	41
Delimitação de linhagens.....	42
Resultados.....	43
Discussão	45
Referências	51
Tabelas.....	56
Legendas das Figuras	59
Figuras	60
Capítulo 2: Genetic differentiation and gene flow of the Amazonian catfish <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> (Castelnau, 1855) across the Madeira River rapids prior to the construction of hydroelectric dams.....	64
Introduction	65
Material and methods	67
Sample collection and DNA extraction	67
Amplification: Microsatellite loci and mitochondrial DNA	68
Data Analysis.....	69
Gene flow	71
Results	71
Genetic diversity microsatellites and COI.....	71
Genetic differentiation.....	72
Connectivity	74
DISCUSSION.....	74
Genetic diversity of <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	74
Genetic Differentiation and Gene Flow	75
Connectivity	77
Impact of hydroelectric dams	79
Acknowledgements	80
References	81
Tables	88
Figure Captions	90
Figures	91
Electronic Supplementary Material	97

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

- Figura 1.** As oito espécies do gênero *Pseudoplatystoma*. (Imagens de Buitrago-Suárez & Burr, 2007). 14
- Figura 2.** Distribuição das espécies de *Pseudoplatystoma* (adaptado de Buitrago-Suárez & Burr, 2007). 15
- Figura 3.** *Pseudoplatystoma punctifer* A1) cluster 1 (479 mm); A2) cluster 2 (462 mm) identificados por García-Dávila *et al.*, (2013). B1) Neótipo de *P. fasciatum* (516 mm) (Buitrago-Suárez & Burr, 2007); B2) Ilustração da descrição original do holótipo de *P. punctifer* (Castelnau, 1855). 17

Capítulo 1

Legendas das Figuras

- Figura 1.** Pontos de coletas referente a 65 localidades de 35 rios para as 8 espécies do gênero *Pseudoplatystoma*. 59
- Figura 2.** Árvore filogenética bayesiana (*Maximum clade credibility tree*) com base em 3.000 árvores posteriores geradas usando o BEAST. O conjunto de dados compreendeu 67 haplótipos, do total de 1.017 de sequências do gene COI de *Pseudoplatystoma* com 658 pares de bases. Probabilidades posteriores com suporte acima de 0.95 são mostradas com pontos vermelhos. As espécies-linhagens genéticas delimitadas pelo modelo mPTP, bGMYC e GMYC são demonstradas por caixas coloridas. A árvore foi apresentada usando o pacote ggtree_1.6.11. 59
- Figura 3.** Árvore filogenética bayesiana (*Maximum clade credibility tree*) com base em 3.000 árvores posteriores geradas usando o BEAST. O conjunto de dados compreendeu 339 haplótipos, do total de **679** de sequências da região controle (RC) de *Pseudoplatystoma* com 855 pares de bases alinhadas (incluindo 18 gaps). Probabilidades posteriores com suporte acima de 0.95 são mostradas com pontos vermelhos. As espécies-linhagens genéticas delimitadas pelo modelo mPTP, bGMYC e GMYC são demonstradas por caixas coloridas. A árvore foi apresentada usando o pacote ggtree_1.6.11. 59
- Figura 4.** Análises de Coordenadas Principais (PCA) para espécies do gênero *Pseudoplatystoma* com base em sequências de DNA. A) Gene COI: 1017 sequências com 658 pares de bases. B) RC: 679 sequências com 855 pares de bases (incluindo 18 gaps). A distância entre os aglomerados é aproximadamente proporcional às distâncias genéticas entre as espécies. As cores foram relacionadas com figura 2 para o COI e com a figura 3 para a RC. 59

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figuras

Figura 1.	60
Figura 2.	61
Figura 3.	62
Figura 4. A) e B).....	63

Capítulo 2

Legendas das Figuras

Fig. 1 Sampling localities of the *Pseudoplatystoma punctifer* used in this study. Sampling localities from the lower Madeira sub-basin, represented in blue (downstream of rapids) - MC, Manicoré; CL, Carapanatuba lake; and PV, Porto Velho. Sampling sites upstream of rapids: GM, Guajará-Mirim on the Mamoré River and CR, Cautário River which is a tributary of Guaporé River. The upper two dashed bars represent the Teotônio and Jirau waterfalls which were submerged by the Santo Antônio and Jirau hydroelectric dams indicated by yellow bars. The other dashed bar represents the Guajará-Mirim rapid, delimiting the Mamoré/Guaporé sub-basin represented in green.....90

Fig. 2 Maximum-likelihood haplotype network of the 11 haplotypes observed in 96 individuals of *Pseudoplatystoma punctifer*. The size of each haplotype is proportional to the number of individuals possessing that haplotype. Colors/shades denote the geographic distribution of these haplotypes.90

Fig. 3 Isolation by distance (IBD) scatter plots showing the results of the Mantel test between the matrix of genetic distances and the matrix of geographic distances of 99 specimens of *Pseudoplatystoma punctifer* sampled between (2005–2009). Local density of points plotted using two-dimensional kernel density estimation. A line representing correlation (r) is shown; colors represent the relative density of points: blue low density, yellow medium density, red high density. **a** For nuDNA (microsatellite) data ($r= 0.536$, $P= 0.08$); **b** For mtDNA (COI) data ($r= 0.905$, $P= 0.01$).90

Fig. 4 Bayesian inference of population structuring inferred in STRUCTURE. The Highest posterior probability and delta K is associated with three genetic clusters of *Pseudoplatystoma punctifer* in lower Madeira and Mamoré/Guaporé sub-basins. **a** Bar plot, each individual is represented by a vertical line. Each color indicates a genetic cluster based on genotypic similarities, the proportion of membership (Q) are shown above the below sampling localities; **b** Mean posterior probabilities of 20 runs for each K ($K = 3$; mean LnProb = $- 2766.165000$) and **c** Delta K statistic.90

Fig. 5 Discriminant analysis of principal components (DAPC) scatterplot for the five sampling localities of *Pseudoplatystoma punctifer*. MC, Manicoré; CL, Carapanatuba lake; and PV, Porto Velho (lower Madeira sub-basin); GM, Guajará-Mirim and CR, Cautário River (Mamoré/Guaporé sub-basin). The optimal number of principal components (PCs = 20) was retained as determined by DAPC cross-validation and 4 discriminant functions. PCA and DA eigenvalues of the analysis are displayed in insets. The graphs represent the individuals as dots and the groups as inertia ellipses. The colors correspond to the three clusters identified by STRUCTURE analysis (green; orange and blue).90

Fig. 6 Schematic representation of the Population Migration (2NM) estimated in the program IMA2 using microsatellite (nuDNA) and mitochondrial (COI) (mtDNA) markers, arrows indicate the direction of gene flow and colours represent sub-basins as indicated in Figure 1.90

Figuras

Fig. 1.91

Fig. 2.92

Fig. 3. a) e b)......93

Fig. 4. a) e b)......94

Fig. 5.95

Fig. 6.96

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Pontos do mapa e localidades de amostragem para as espécies de *Pseudoplatystoma* número total de amostras sequenciados para cada marcador..... 56

Tabela 2. Distância genética em porcentagem entre as espécies-linhagens delimitadas pelo mPTP, bGMYC e GMYC para *Pseudoplatystoma* com base no COI. 58

Tabela 3. Distância genética entre as espécies-linhagens delimitadas pelo bGMYC e GMYC para *Pseudoplatystoma* com base na RC..... 58

Capítulo 2

Table 1 Genetic diversity estimates of *Pseudoplatystoma punctifer* sampled from five localities for two sub-basins, screened for 10 microsatellite loci (*nuDNA*) and COI sequences (*mtDNA*).88

Table 2 Pairwise comparison of N_m (above) and F_{ST} (below) values of *Pseudoplatystoma punctifer* sampled from five localities. Estimates based on 10 microsatellite loci.89

Table 3 Pairwise comparison of N_m (above) and Φ_{st} (below) values of *Pseudoplatystoma punctifer* sampled from five localities. Estimates based on 536 pb of the mtDNA (COI).89

Electronic Supplementary Material97

1. Introdução geral

1.1. Diversidade de Peixes

As águas doces, salobras e salgadas do mundo abrigam cerca de 35.423 espécies válidas de peixes, de acordo com o *Catalog of Fishes* (Eschmeyer, 2020), das quais pelo menos 4.231 têm distribuição na região Neotropical (Lévêque et al., 2008). Este número continua aumentando, podendo chegar a mais de 6.000 espécies, incluindo espécies reconhecidas, mas ainda não descritas (Reis *et al.*, 2003). Considerando os peixes de água doce, existe registro de elevado endemismo de espécies pertencentes às Ordens Characiformes e Siluriformes. A província da Amazônia (bacia Amazônica, do Orinoco, do Araguaia-Tocantins, do Paraíba e dos rios costeiros das Guianas) apresenta o maior nível de endemismo do mundo com 2.072 espécies de peixes. Seguida da província do Paraná (bacia do São Francisco, do Paraná-Paraguai e La Plata) com 517 espécies (Lévêque *et al.*, 2008).

Os grandes bagres (Siluriformes: Pimelodidae) constituem um dos grupos mais significativos, em termos de diversidade da ictiofauna da região Neotropical (Ferraris, 2007). A principal característica desta Ordem é a ausência de escamas, os peixes são revestidos por pele espessa ou por placas ósseas (total ou parcialmente). São conhecidos como peixes lisos, bagres, cascudos, acaris, entre outros (Santos *et al.*, 2006; Buitrago-Suárez & Burr, 2007).

De acordo com o *Catalog of Fishes* (Eschmeyer, 2020) a família Pimelodidae é constituída por 63 gêneros com 202 espécies. Muitas das espécies desta família têm grande importância ecológica como predadores de topo de cadeia, como por exemplo: a dourada (*B. rousseauxii*), a piramutaba (*B. vaillantii*), a piraíba (*B. filamentosum*), o jaú (*Zungaro zungaro*) e o surubim (*P. punctifer*). Além do que, estas espécies são usadas como fonte de alimento por populações locais, gerando emprego e renda (Barthem & Goulding, 1997). Considerando, a importância comercial e ecológica dessas espécies, estudos genéticos populacionais são indispensáveis para subsidiar políticas de conservação e manejo destas, na bacia Amazônica.

1.2 O Gênero *Pseudoplatystoma* - taxonomia e filogenética

O Gênero *Pseudoplatystoma* é exclusivamente de água doce e possui ampla distribuição na América do Sul (Buitrago-Suárez & Burr, 2007). Durante muito tempo, a riqueza de espécies deste gênero foi subestimada pela falta de estudos taxonômicos,

que pudessem delimitar e descrever as espécies. A delimitação de espécies é o processo de determinar o que é uma espécie e, portanto, requer um conceito de espécie associado. Para o gênero *Pseudoplatystoma* eram reconhecidas apenas três espécies: *P. fasciatum*, *P. tigrinum* e *P. corruscans* (Welcome, 1985; Petrere, 1995; Lundberg & Littmann, 2003). Atualmente, após a revisão do gênero realizada por Buitrago-Suárez & Burr, (2007) são reconhecidas oito espécies (Figura 1). As espécies foram determinadas, reconhecidas, diagnosticadas e descritas seguindo o conceito morfológico de espécies. Estes autores validaram as espécies *P. punctifer* (Castelnau, 1855) e *P. reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) e descreveram três novas espécies: *P. orinocoense*, *P. metaense* e *P. magdaleniatum*.

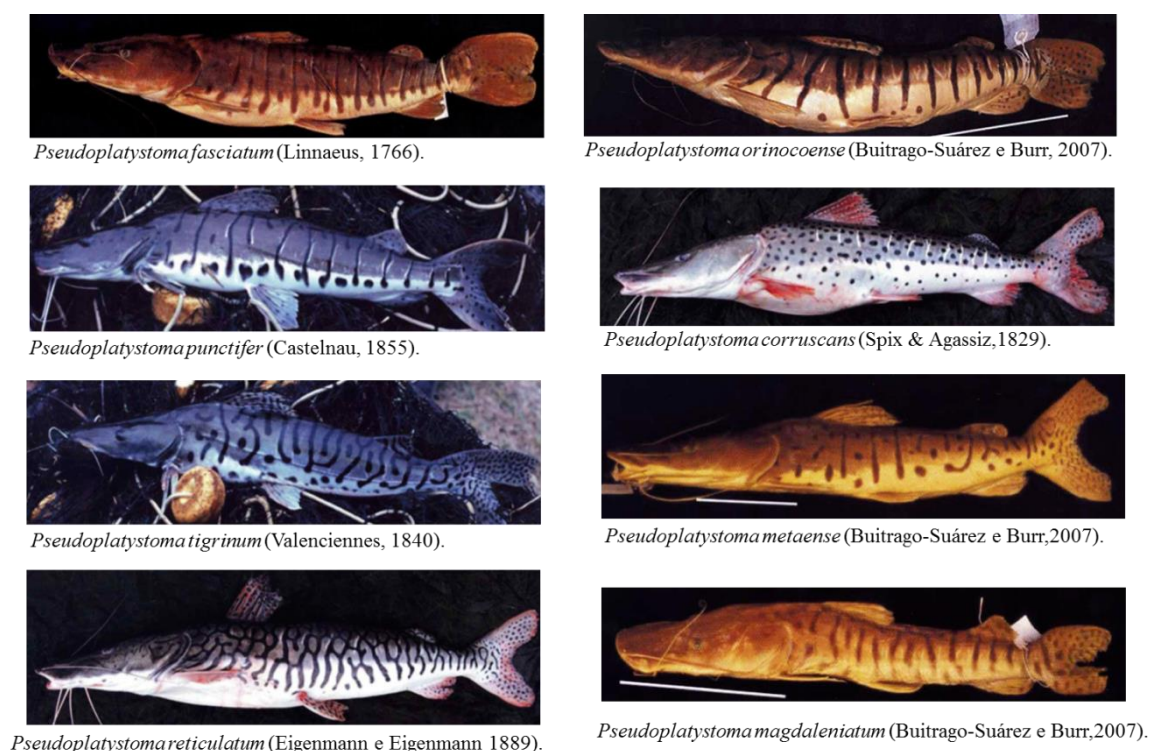


Figura 1. As oito espécies do gênero *Pseudoplatystoma*. (Imagens de Buitrago-Suárez & Burr, 2007).

As espécies do gênero *Pseudoplatystoma* possuem a seguinte distribuição geográfica (Figura 2): *P. punctifer* e *P. tigrinum* são simpátricas na bacia Amazônica; *P. metaense* e *P. orinocoense* são simpátricas na bacia do Orinoco; *P. reticulatum* e *P. corruscans* são simpátricas nas bacias do Paraná-Paraguai, com *P. corruscans* ocorrendo também na bacia do São Francisco; *P. reticulatum* ocorre também na

Amazônia central (holótipo: MCZ 23813, originário do rio Negro). *P. magdaleniatum* ocorre na Bacia do rio Magdalena e *P. fasciatum* nos rios das Guianas.

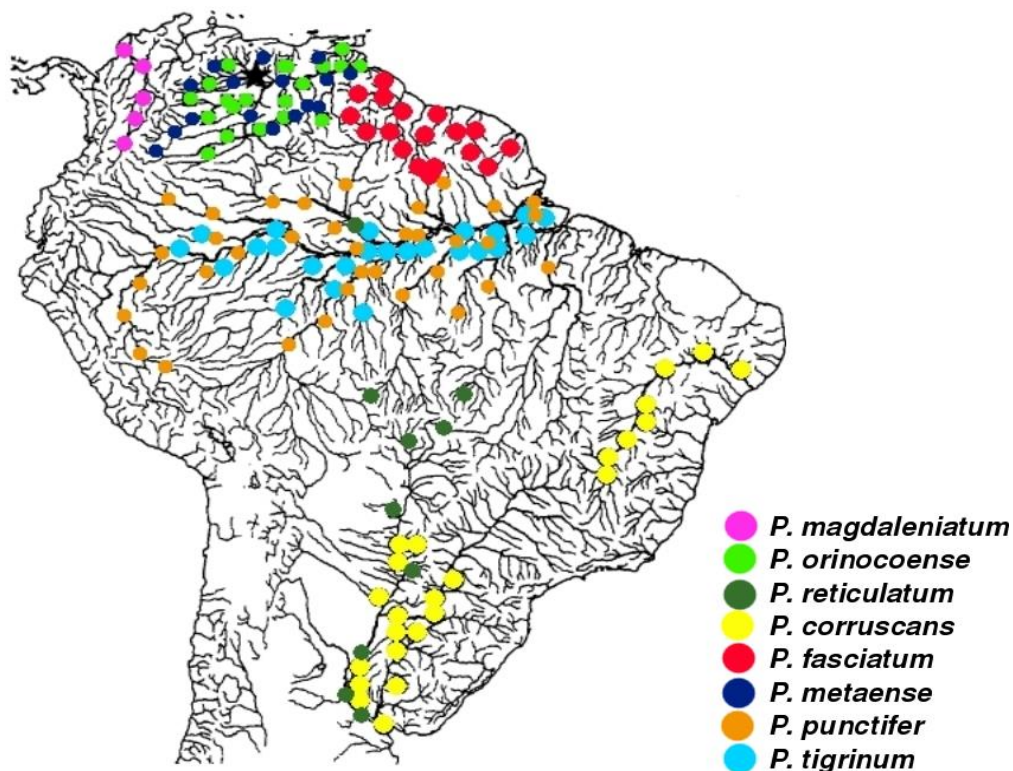


Figura 2. Distribuição das espécies de *Pseudoplatystoma* (adaptado de Buitrago-Suárez & Burr, 2007).

Existem divergências na literatura atual, com relação a distribuição e ao real número de espécies de *Pseudoplatystoma*, considerando os resultados taxonômicos (Buitrago-Suárez & Burr, 2007) e moleculares (Torrico *et al.*, 2009; Carvalho-Costa *et al.*, 2011).

Usando os dados de marcadores moleculares da região controle (RC) e citocromo b (Cit-b) do DNA mitocondrial, Torrico *et al.* (2009) validaram o estado taxonômico de *P. corruscans*, *P. reticulatum*, *P. tigrinum* e *P. magdaleniatum*. Sequências nucleotídicas da região controle, correspondentes a *P. metaense* e *P. orinocoense*, ambos da bacia do Orinoco, resultaram em um único clado. Não foi verificada diferenciação genética entre estas duas espécies, que são morfologicamente distintas. No entanto, os próprios autores afirmam que, uma maior amostragem e análises complementares, são necessárias para definir a relação filogenética exata entre as espécies da bacia do Orinoco. Da mesma forma, não foi possível diferenciar *P. punctifer* (da bacia Amazônica) de *P. fasciatum* (da bacia das Guianas), em nível molecular (Torrico *et al.*, 2009).

Lundberg *et al.*, (2011) estudando a filogenia de Pimelodidae da América do Sul, analisaram mais de sete kilobases de sequências nucleotídicas, dos genes nucleares RAG1 e RAG2, e os genes mitocondriais 12S, 16S e citocromo b. Os autores reconheceram quatro espécies de *Pseudoplatystoma*: *P. magdaleniatum*, *P. corruscans*, *P. fasciatum* e *P. tigrinum*. Note-se que para este gênero os autores usaram apenas um espécime para cada espécie.

Carvalho-Costa *et al.*, (2011) com base na sistemática molecular do gênero *Pseudoplatystoma*, usando os marcadores RAG1 (intron), S7 e Cit-b, sugerem a divisão em apenas quatro espécies: *P. magdaleniatum*, *P. corruscans*, *P. tigrinum* (*lato sensu*) e *P. fasciatum* (*lato sensu*). Estes autores afirmam que a questão continua mal resolvida e que outros marcadores moleculares podem ser a solução.

Segundo Hausdorf *et al.*, (2011) as sequências de RAG1 dificilmente contribuirão para a reconstrução de árvores filogenéticas e não são úteis para distinguir espécies, porque há pouca variação dessas sequências entre os grupos e o polimorfismo é compartilhado entre as espécies. Carvalho-Costa *et al.* (2011) sugeriram, que seja feita uma reavaliação crítica dos caracteres morfológicos, utilizados para a separação destas espécies.

Espécies crípticas de peixes do gênero *Pseudoplatystoma* foram identificadas com o uso de sete locos microssatélites e marcadores do mtDNA (região controle, RC 854 pb; COI 576 pb). A RC e os microssatélites foram mais precisos na identificação molecular (García-Dávila *et al.*, 2013). Nesse trabalho, foram coletados 103 espécimes adultos de *P. punctifer* (83) e *P. tigrinum* (20), as coletas foram realizadas em um mercado de Iquitos no Peru. Foram identificados dois clusters dentro do grupo de *P. punctifer*, os quais apresentam também diferenças no padrão de coloração corporal (Figura 3). Apesar de terem sido usados sete locos microssatélites, apenas três locos tiveram alelos exclusivos para identificação de *P. punctifer* cluster 1 e dois locos para o cluster 2.

De acordo com García-Dávila *et al.* (2013) o cluster 1 é mais abundante na bacia Amazônica e pode corresponder a *P. fasciatum* (Linnaeus, 1766), já o cluster 2 pode corresponder a *P. punctifer* (Castelnau, 1855) (Figura 3). No entanto, de acordo com os autores, outras análises morfológicas por taxonomistas são obviamente necessárias, para confirmar esta hipótese e para tentar encontrar coerência entre os dados morfológicos e moleculares.

Quando descrito por Linnaeus, (1766) *P. fasciatum* tinha como localidade tipo o Brasil (bacia Amazônica) e os rios das Guianas. No entanto, o primeiro revisor do gênero (Mees, 1974) restringiu a distribuição desta espécie às Guianas, distribuição essa que foi seguida pelos últimos revisores (Buitrago-Suárez & Burr, 2007).

Embora tenham sido identificadas espécies crípticas na região do Peru (*P. fasciatum* e *P. punctifer*), o conhecimento sobre a variabilidade genética e a distribuição dessas duas espécies ao longo da bacia Amazônica ainda continuam desconhecidas.

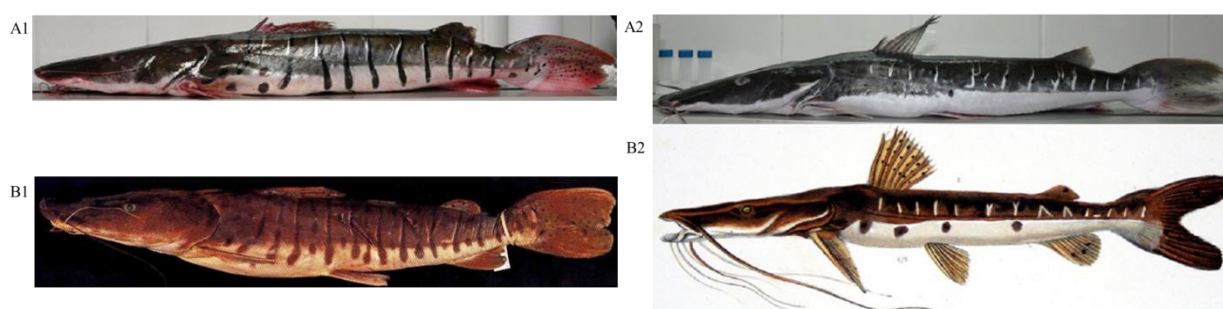


Figura 3. *Pseudoplatystoma punctifer* A1) cluster 1 (479 mm); A2) cluster 2 (462 mm) identificados por García-Dávila *et al.*, (2013). B1) Neótipo de *P. fasciatum* (516 mm) (Buitrago-Suárez & Burr, 2007); B2) Ilustração da descrição original do holótipo de *P. punctifer* (Castelnau, 1855).

A questão taxonômica do gênero *Pseudoplatystoma* mostra-se complexa à medida que estudos moleculares vêm sendo realizados (Torrico *et al.*, 2009; Carvalho-Costa *et al.*, 2011; García-Dávila *et al.*, 2013). Todos os trabalhos sugerem a realização de mais estudos, quer seja com um número amostral maior por espécie, quer seja pela revisão de caracteres morfológicos ou o uso de outros marcadores moleculares. Portanto, é uma questão ainda aberta.

1.3 Identificação molecular de espécies

As incertezas taxonômicas resultam, predominantemente, da ausência de dados adequados. A descrição de muitas espécies é baseada em informações limitadas, sobre a distribuição geográfica, sobre um pequeno número de características (geralmente morfológicas), sendo a base genética totalmente desconhecida na maioria das vezes (Frankham *et al.*, 2004). As limitações inerentes à identificação baseada na morfologia, tais como: a plasticidade fenotípica e os caracteres utilizados para reconhecimento de

espécies, a negligência de táxons morfológicamente crípticos, comuns em muitos grupos, pode conduzir a identificações incorretas (Knowlton, 1993; Jarman e Elliott, 2000). Outra limitação resulta do uso de chaves de identificação, que muitas vezes exige um nível elevado de conhecimento. Essas e outras limitações são comuns (Hebert *et al.*, 2003) e podem levar ao agrupamento incorreto de espécies diferentes, dentro de uma única espécie, deixando sem proteção espécies em perigo (Frankham *et al.*, 2004).

A precisão taxonômica sempre foi uma questão crucial para os conservacionistas que usaram ao longo do tempo, análises genéticas que estavam ao alcance, para a delimitação de espécies. Há mais de 40 anos, a eletroforese de proteínas (isoenzimas) em géis de amido foi, pela primeira vez, utilizada para identificar espécies (Manwell e Baker, 1963). Nos estudos taxonômicos essas “novas” categorias de dados têm sido sempre adicionadas aos dados morfológicos, nunca pretendendo substituí-los (Henriques, 2010).

Tautz *et al.*, (2002) afirmam que um sistema baseado na taxonomia do DNA “DNA Taxonomy” pode ser construído para integrar os pontos fortes do sistema tradicional. Constituindo-se em um novo pilar para o conhecimento taxonômico acumulado, sendo uma ferramenta molecular confiável para descrição e identificação de espécies.

Na verdade, há um número crescente de casos em que sistemas de identificação baseados em DNA têm sido aplicados para organismos superiores (Brown *et al.*, 1999; Bucklin *et al.*, 1999; Trewick, 2000; Vincent *et al.*, 2000). Porém, a utilização do DNA foi usada apenas como um critério adicional para identificação de uma espécie ou de um táxon, sem tentar dar-lhe um papel central (Tautz *et al.*, 2002). Esse tipo de abordagem só foi possível com os avanços técnicos da genética molecular, que inclui o advento da PCR (*polymerase chain reaction*) reação de polimerase em cadeia e do sequenciamento de DNA, como rotina em laboratórios de biologia (Sunnucks, 2000).

As sequências de DNA podem ser vistas como *Barcode* (códigos de barras) genéticos que são incorporados em cada célula (Herbert *et al.*, 2003). O termo *Barcode* em estudos genéticos foi usado primeiramente por Arnot *et al.*, (1993). Estes autores sugeriram, o uso da extrema variabilidade do DNA como *Barcoding*, para identificar populações e linhagens do parasita *Plasmodium falciparum*. Basearam-se em informações sobre a variação de sequências de DNA nuclear, repetidas em *tandem* e de alelos hipervariáveis ligados ao gene CS (*citrate synthase*). (Hebert *et al.*, 2003) propuseram, para metazoários, o uso de curto segmento de 648 nucleotídeos do gene

mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) como DNA *Barcoding*, dando-lhe um papel central de utilização, referência universal para identificação de espécies já descritas e para descrição de novas espécies. O uso do gene COI como marcador molecular tem algumas vantagens. Disponibilidade de *primers* universais para este gene, que permitem a recuperação de sua extremidade 5', representativa da maioria dos filos de animais (Folmer *et al.*, 1994; Zhang & Hewitt, 1997).

1.4 DNA *Barcode* de peixes

O primeiro grande trabalho com DNA *Barcode* de peixes foi de Ward *et al.*, (2005), no qual foram analisadas duzentas e sete espécies de peixes marinhos da costa australiana. Todas as espécies foram diferenciadas por sua sequência nucleotídica do gene COI. Os autores observaram que determinados taxa mostraram níveis de divergência genética maior do que outros. Embora, o DNA *barcode* vise o sistema de identificação de espécies, algum sinal filogenético foi aparente nos dados. Três grupos taxonômicos foram analisados mais rigorosamente: os atuns do gênero *Thunnus*, que apresentaram divergência média interespecífica de 1,11%; os peixes cachorros do gênero *Squalus*, que apresentaram divergência média interespecífica de 4,17% e os peixes de cabeça chata da família *Platycephalidae* (gêneros *Platycephalus*, *Neoplatycephalus* e *Cymbacephalus*) que apresentaram divergência média dentro dos gêneros de 15,55%.

Evidências de diferenciação do DNA nuclear levaram a suspeitar que as espécies de atuns, tiveram divergência relativamente recente (Elliott e Ward, 1995). Os resultados de Elliott e Ward, (1995) foram corroborados pelas análises do gene mitocondrial COI (Ward *et al.*, 2005). As diferenças entre espécies de um mesmo gênero, provavelmente, refletem a idade média de divergência entre as espécies, embora dentro de alguns gêneros algumas espécies sejam mais velhas do que outras (Ward *et al.*, 2005).

Hebert *et al.*, (2003), usando o DNA *barcode*, observou um limiar de divergência genética interespecífico de 3% para *Lepidoptera*. Mas, deixaram claro que este limiar não é uma regra para a identificação de todas as espécies. Os limiares podem ser menores do que se poderia esperar, como foi observado nos atuns (Ward *et al.*, 2005). De modo que limiares de divergência genética precisam ser estabelecidos para os diferentes grupos taxonômicos de diferentes regiões geográficas, com base em características, tais como, tempo de geração ou regime de dispersão, que são

susceptíveis de alterar as taxas de evolução molecular ou a extensão da subdivisão populacional (Hebert *et al.*, 2003). De acordo com Bermingham *et al.* (1997) uma divergência de 1-3% é alcançada a cada 1 milhão de anos, entre sequências do gene COI para peixes marinhos do Istmo do Panamá.

O sucesso da identificação de espécies de DNA *barcode* baseia-se na diferença entre as divergências genéticas intra e interespecíficas, o chamado *barcode gap* (Herbert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004a e Meyer e Paulay, 2005).

Em um dos primeiros trabalhos para peixes na região neotropical usando sequências de genes mitocondriais COI e ND2 (NADH dehydrogenase subunidade 2), foi observado o valor 5,39% de divergência para o gene COI e 10,39% para o gene ND2, entre *Prochilodus magdalenae* (nome popular Curimatã) da bacia do Magdalena e outras espécies de *Prochilodus* da bacia do Orinoco e da bacia Amazônica (Turner *et al.*, 2004).

No entanto, para arraias do gênero *Potamotrygon* a identificação através do COI não foi eficiente. De dez espécies de arraias do gênero *Potamotrygon* estudadas, 40% não foram discriminadas pelos critérios do DNA *barcode*, tendo sido observado o compartilhamento de haplótipos entre *P. motoro*, *P. orbignyi*, e *P. scobina* e uma pequena divergência genética de 0,8% entre sequências de *P. aff. schroederi* da Venezuela e *P. schroederi* do Rio Negro (Toffoli *et al.*, 2008).

Ortiz (2010), estudando o DNA *barcode* de quatro espécies do gênero *Pseudoplatystoma*, observou uma média da divergência genética intraespecífica de 0,10% e intraespecífica de 3,08%, com altos valores de *Bootstrap*. A distância genética entre *P. fasciatum* (atual *P. punctifer*), *P. tigrinum* e *P. reticulatum* são menores que 3% e a distância genética entre *P. tigrinum* e *P. reticulatum* foi de apenas 1,6%. Vale destacar que o COI não foi eficiente em separar morfotipos diferentes de *Pseudoplatystoma* na região do Peru (García-Dávila *et al.*, 2013).

Ardura *et al.*, (2010) identificaram, utilizando métodos do DNA *barcode* seis espécies de peixes diferentes (originárias de 4 localidades na Amazônia: Tefé, Manaus, Novo Airão e no rio Tapajós. Estas espécies eram comercializadas com o nome de Acarás e consideradas nas estatísticas pesqueira como se fossem apenas uma unidade biológica. Erros e imprecisões de identificações de espécies comerciais, pode mascarar as estatísticas de pesca de uma ou algumas espécies (Garcia-Vazquez *et al.*, 2009).

Pereira *et al.*, (2013), utilizando o método do DNA *barcode*, analisaram 254 espécies de peixes totalizando 1.244 amostras coletadas em 208 sítios de amostragem na

bacia do alto rio Paraná. Concluíram que o método do DNA *barcode* é muito eficaz, discriminando corretamente 252 das 254 espécies analisadas. Usaram a abordagem de distância genética (*Neighbour joining*, NJ e *Kimura-2-parâmetros*, K2P), demonstrando a existência *barcode* gap para as espécies analisadas, confirmando a sua utilidade como uma ferramenta poderosa para determinação de espécies.

O uso de 2% de divergência como limiar para a delimitação de espécies, mostrou-se útil para 80% das comparações interespecíficas, no caso de peixes neotropicais de água doce (Pereira *et al.*, 2013).

No entanto, para cinco gêneros (*Astyanax*, *Characidium*, *Neoplecostomus*, *Hypostomus* e *Trichomycterus*), observou-se que o valor máximo de divergência genética intraespecífica excede o valor mínimo observado dentro do gênero. Estes casos devem ser cuidadosamente analisados para a identificação das espécies. O uso de 2% de divergência como valor de corte, pode esconder a verdadeira diversidade do grupo (Pereira *et al.*, 2013).

Existem críticas quanto ao uso dos valores de divergência genética do DNAm como único critério para delimitação de espécies (Hausdorf *et al.*, 2011). Em alguns casos, as espécies estreitamente relacionadas, podem ter divergido há “pouco tempo” para serem claramente separadas (Toffoli *et al.*, 2008; Steinke *et al.*, 2009; Serra-Pereira *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2011).

1.5 Genética de populações nos diferentes tipos de água da bacia Amazônica

A genética de populações diz respeito à origem, quantidade e distribuição da variabilidade genética presente em populações de organismos e ao destino desta variação no tempo e no espaço (Templeton, 2011).

Do ponto de vista da conservação, é importante e necessário entender a distribuição da variação genética das espécies, dentro e entre populações naturais (Spruell *et al.*, 2003). A variabilidade genética permite que as espécies se mantenham no tempo e no espaço, adaptando-se aos efeitos das flutuações ambientais (O’Connel e Wright, 1997).

Em peixes, a variabilidade genética intraespecífica tem despertado um grande interesse devido a sua importância tanto na aquicultura como no manejo da pesca (Ramírez, 2001). A variabilidade genética inter e intrapopulacional é a base fundamental de qualquer programa de melhoramento genético. Mediante a seleção

artificial e/ou a manipulação genética dos genótipos de uma dada população com características desejáveis, que os espécimes são escolhidos, incluindo-se aspectos econômicos e comerciais (Zapata, 1987). Assim, é muito importante conservar as populações naturais, fontes da variabilidade genética, matéria prima para aumentar a produtividade e o valor comercial das espécies de peixes de cativeiro (Ramírez, 2001). Portanto, o conhecimento da variabilidade genética entre populações naturais tem grande importância para a formulação de planos de manejo da pesca.

Os trabalhos de genética de populações de peixes da Amazônia, que têm importância comercial devido à utilização na alimentação e ornamentação, identificaram pelo menos três padrões populacionais na bacia amazônica: espécies que não apresentam estruturação genética, tais como a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) (Batista & Alves-Gomes, 2006; Batista, 2010), piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) (Formiga-Aquino, 2004), filhote capapreta (*Brachyplatystoma capapretum*) (Lira, 2013), o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Santos, 2018), o curimatã (*Prochilodus nigricans*) (Machado *et al.*, 2016) e o jaraqui (*Semaprochilodus insignis*) (Passos, 2009); espécies com padrões de diferenciação genética, amplamente distribuídas em regiões geográficas na bacia amazônica, como a piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*) (Huergo, 2009), o aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*) (Silva, 2009) e o pirarucu (*Arapaima gigas*) (Hrbek *et al.*, 2005; Hrbek *et al.*, 2007); e espécies com padrões de forte estruturação populacional, como o acará-disco (*Symphysodon spp.*) (Farias & Hrbek, 2008, Amado *et al.*, 2011), o babão (*Brachyplatystoma platynemum*) (Ochoa *et al.*, 2015) e o peixe borboleta (*Carnegiella marthae*) (Piggott *et al.*, 2011).

Um dos fatores que pode estar contribuindo para a forte diferenciação genética que vem sendo observada em algumas espécies de peixes amazônicos é o tipo de água do rio onde ocorrem (Huergo, 2009; Cooke *et al.*, 2012a; Cooke *et al.*, 2012b; Cooke *et al.*, 2014).

Os rios amazônicos são diferentes não apenas na morfologia de seus cursos, mas também nas composições dos sedimentos, características físico-químicas e características ópticas de suas águas (Sioli, 1984). Com base nestes fatores Sioli (1984) classificou as águas dos rios amazônicos em três tipos: brancas, claras e pretas.

As águas brancas têm origem andina, apresentam-se turvas e com coloração barrenta, em razão de carrearem grandes quantidades de sólidos em suspensão, resultantes dos processos de erosão das margens dos rios e da Cordilheira dos Andes

(Barthem *et al.*, 2004). Os sedimentos em suspensão conferem à água branca uma composição química rica em sais minerais, com pH quase sempre próximo ao neutro (6,5 a 7) e alta condutividade ($> 60 \mu\text{S/cm}$) (Meade *et al.*, 1979; Schmidt 1982; Guerra *et al.*, 1990). Os rios de águas claras são relativamente transparentes e originam-se nos escudos: Brasileiro e das Guianas e contém um baixo teor de sólidos em suspensão (Barthem *et al.*, 2004). Como resultado, estas águas são quimicamente puras, com baixa condutividade ($6\text{-}5 \mu\text{S/cm}$) e um pH quase neutro (5-6) (Sioli, 1967). Já a cor escura dos rios de águas pretas, está relacionada às grandes concentrações de ácidos orgânicos. A matéria orgânica das folhas e troncos, depositados sobre os solos arenosos das campinas e campinaranas que circundam os rios, é completamente decomposta. A porosidade dos solos permite a lixiviação dos ácidos húmicos na forma coloidal até os rios, reduzindo o pH (4 e 5,5) da água e gerando a característica de coloração escura destes rios, que apresentam condutividade até $8 \mu\text{S/cm}$ (Junk, 1997; Barthem *et al.*, 2004).

Entender como a heterogeneidade ambiental influencia na distribuição da variação genética e na evolução da biodiversidade, no ecossistema amazônico, é de fundamental importância, para que sejam tomadas medidas de conservação, diante das ações antrópicas, mudanças ambientais e climáticas (Cooke *et al.*, 2012a; Cooke *et al.*, 2012b).

Huergo (2009) através de análises moleculares observou forte estruturação genética e a existência de três clados de *Brachyplatystoma filamentosum*. À primeira vista, supõem-se uma forte relação com os três diferentes tipos de águas para os rios da bacia Amazônica. O isolamento genético dos clados podem ter sido acentuados por adaptações fisiológicas de *B. filamentosum*. Nesse contexto, as diferenças na composição química das águas seriam uma barreira ao fluxo gênico, mesmo na ausência de barreiras geográficas. Foram considerados que esses clados de *B. filamentosum* correspondem a “estoques pesqueiros”, uma denominação geral recomendada pelo Grupo Consultivo Internacional de Pesquisa em Agricultura (CGIAR) para as diferentes categorias de recursos genéticos aquáticos (Pullin, 2000).

De acordo com Beaumont & Hoare (2003) são usadas várias denominações para grupos geneticamente diferenciados: “variedades”, “raças”, “linhagens”, “populações” e “estoques”. Estes termos são utilizados desde o passado para descrever diferenciação genética dentro das espécies, mas nem sempre foram claramente definidos. No caso da biologia pesqueira, a palavra “estoque” tem sido frequentemente utilizada pelos gestores de pesca.

Alguns termos vêm sendo utilizados em sinonímia na literatura para denominar grupos geneticamente diferenciados, o que inclui “Unidades de Conservação” (*Conservation Units*, CUs) que são unidades populacionais identificadas dentro da espécie (Fraser & Bernatchez, 2001; Allendorf & Luikart, 2007; Funk *et al.*, 2012). O termo “estoque” significa: população intercruzante geneticamente homogênea (pool de genes comum), cujos indivíduos possuem os mesmos parâmetros de crescimento e mortalidade, que habitam uma área geográfica particular, geneticamente distinguível de outros estoques contemporâneos e passível de ser manejado (Larkin, 1972; Jamielson, 1973; Sparre & Venema, 1995; Batista, 2010).

Identificar Unidades de Conservação ou estoque é o primeiro passo para que os gestores conheçam unidades populacionais que devem ser conservadas separadamente (Funk *et al.*, 2012). Não é possível avaliar o status de uma população ou desenvolver uma gestão estratégica, para aumentar as taxas de crescimento da população, sem sabermos os limites populacionais (Funk *et al.*, 2012).

Neste sentido o manejo da pesca e a aplicação de modelos estatísticos para administração pesqueira dependem do conhecimento da diferenciação genética populacional das espécies (Ramírez, 2001).

1.6 Marcadores Moleculares utilizados em espécies do gênero *Pseudoplatystoma* para estudos genéticos populacionais

Para *Pseudoplatystoma* foram utilizados: marcadores isoenzimáticos e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Ramírez, 2001), isoenzimáticos e PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Coronel *et al.*, 2004), sequência de DNA de marcadores mitocondriais (COI e *D-loop*) e microssatélites (Abreu *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Torrico *et al.*, 2009; Carvalho-Costa *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; García-Dávila *et al.*, 2013).

Ramírez (2001), avaliando a genética populacional de duas espécies de bagres na Amazônia, *Pseudoplatystoma fasciatum* (surubim) (atual *P. punctifer*), *P. tigrinum* (caparari), coletadas nas bacias hidrográficas, Magdalena, Orinoco e Amazônica, observou que a maioria dos locos de isoenzimas analisados apresentaram-se monomórficos para duas espécies. Porém, ao analisar dois sistemas isoenzimáticos PGI (Glucose-6-fosfato isomerase) e MDHP (Malato desidrogenase) e cinco marcadores RAPD foi possível observar um alto grau de diferenciação genética entre as populações nas diferentes bacias hidrográficas.

Coronel *et al.* (2004), também usando locos de isoenzimas, observaram um baixo nível (ou ausência) de diferenciação genética em populações de *P. fasciatum* (atual *P. punctifer*) dos rios Beni e Ichilo da sub-bacia Boliviana, no entanto, usando PCR-RFLP para três marcadores mitocondriais: NADH *dehydrogenase* subunidade 2 (ND2), Citocromo-b e *D-loop* detectaram diferenciação genética de linhagem materna entre as duas populações dos dois rios e que as mesmas passaram por um declínio populacional.

Abreu *et al.* (2009) usando sete marcadores microssatélites, observaram alta estruturação genética entre duas populações de *Pseudoplatystoma reticulatum* de dois rios da bacia do Paraguai. Diferenciação genética que também foi observada para *P. corruscans*. Pereira *et al.*, (2009) confirmaram a divisão *P. corruscans* em seis grupos, que coincidem com seis rios onde foram amostrados na bacia do Paraguai.

Existem semelhanças morfológicas entre os espécimes de *P. corruscans* oriundos da bacia do São Francisco e espécimes da bacia do Paraná-Paraguai. Apesar desta semelhança, Carvalho *et al.* (2012), usando COI e microssatélites, identificaram alta divergência genética entre as populações de *P. corruscans* destas duas bacias. Estas diferenças foram associadas com a separação histórica destas bacias hidrográficas, indicando fortemente que os dois grupos populacionais de *P. corruscans* evoluíram independentemente, a partir de um ancestral comum. Estas populações foram classificadas como duas UES (Unidade Evolutiva Significativa) (*Evolutionarily significant units*, ESUs) distintas.

Telles *et al.*, (2014) usando sete microssatélites heterólogos, observaram uma alta correlação entre distancia genética e geográfica para *P. punctifer*, ao longo do rio Madeira, resultado que foi relacionado a uma escala de migração local para essa espécie.

Estes estudos, abordando a variabilidade genética de *P. punctifer*, restringiram-se a rios de águas brancas e não levaram em consideração a possível existência de outra espécie, a espécie críptica *P. fasciatum*, como observado por García-Dávila *et al.*, (2013).

2. Justificativas

Os grandes bagres do gênero *Pseudoplatystoma* são espécies de alto valor comercial, são predadores de topo (Barthem & Goulding, 1997; 2007) e como tal, têm papel fundamental na manutenção do equilíbrio da cadeia alimentar nas bacias hidrográficas onde ocorrem (Winemiller & Jepsen, 1998; Lucas & Baras, 2001; Winemiller, 2005). Alterações na abundância dos predadores de topo, frequentemente, levam a intensas alterações dos ecossistemas através de efeitos em cascata (Pace *et al.*, 1999; Myers *et al.*, 2007).

O manejo adequado e a conservação das espécies de *Pseudoplatystoma* e de outros grandes bagres pimelodídeos são cruciais, marcadamente nos ecossistemas amazônicos. Para que, isto seja possível, o status taxonômico das diferentes espécies precisa ser determinado acuradamente. Estudos recentes representam esforços neste sentido, mas a taxonomia do gênero *Pseudoplatystoma* ainda permanece indefinida (Buitrago-Suárez & Burr, 2007; Torrico *et al.*, 2009; Carvalho-Costa *et al.*, 2011; García-Dávila *et al.*, 2013).

Além da exploração pesqueira as espécies de *Pseudoplatystoma* podem estar ameaçadas pelas construções de hidroelétricas, desmatamento e contaminação (Carolsfeld *et al.*, 2003). Estes são os principais fatores que podem contribuir para extinção e aumento dos efeitos estocásticos ambientais e genéticos dentro das populações (Frankham *et al.*, 2004). E, principalmente, pela exploração pesqueira é que *P. reticulatum* e *P. corruscans* se encontram vulneráveis a extinção, de acordo com as categorias de ameaça recomendadas pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) nas bacias do Paraná-Paraguai (Marques *et al.*, 2002).

Este trabalho justifica-se, pela importância da avaliação da riqueza de espécies do gênero *Pseudoplatystoma*, o que é possível usando métodos de delimitação de espécies-linhagens. Assim como, o conhecimento da dinâmica evolutiva e os padrões de distribuição da diversidade genética, do surubim *P. punctifer*, nos diferentes tipos de água da bacia amazônica, é indispensável, ao manejo adequado e conservação dessa espécie.

3. Objetivos

Os objetivos de cada capítulo foram os seguintes:

Capítulo 1. Testar o COI e a RC como uma ferramenta de avaliação da biodiversidade com base nos métodos de delimitação de espécies-linhagens de locus único para o gênero *Pseudoplatystoma*.

Capítulo 2. Estimar a diversidade, diferenciação genética e fluxo gênico de *P. punctifer* entre as sub-bacias dos rios Mamoré/Guaporé e a sub-bacia do rio Madeira, utilizando amostras obtidas antes das construções das duas hidrelétricas.

4. Referências bibliográficas

- Abreu, M. M.; Pereira, L. H. G.; Vila, V. B.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2009. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. *Genetics and Molecular Biology*, n. 32, p. 868-873.
- Allendorf, F. W.; Luikart, G. 2007. Genetics and the Conservation of Populations. Blackwell Publishing.
- Amado, M. V.; Farias, I. P.; Hrbek, T. 2011. A Molecular Perspective on Systematics, Taxonomy and Classification Amazonian Discus Fishes of the Genus *Symphysodon*. *International Journal of Evolutionary Biology*, Article ID 360654, 16 pages.
- Ardura, A.; Linde, A. R.; Moreira, J. C.; Garcia-Vazquez, E. 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*, v. 143, n.1438-1443.
- Arnot, D. E.; Roper, C.; Bayoumi, R. A. L. 1993. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*. n. 61, p.15-24.
- Barthem, R. B.; Goulding, M. 2007. An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries. Gráfica Biblos, Lima. Botanical Garden Press. Missouri. p. 241.
- Barthem, R.; Goulding, M. 1997. The Catfish Connection: Ecology Immigration and Conservation of Amazonas Predators, first ed. Columbia University Press, New York.
- Barthem, R. B.; Charvet-Almeida, P.; Montag, L. F. A.; Lanna, A. E. 2004. Amazon Basin, GIWA Regional assessment 40b. University of Kalmar, Kalmar, Sweden. United Nations Environment Programme.
- Batista, J. S. 2010. Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes-Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo/ Jacqueline da Silva Batista. Manaus. Tese de Doutorado. INPA. Manaus.
- Batista, J. S. Alves-Gomez, J. A. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetic and Molecular Research*. n. 5, v.4, p. 723-740.
- Beaumont, A.; Hoare, K. 2003. Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture. Wiley-Blackwell; 1 edition.
- Bermingham, E.; McCafferty, S. S.; Martin, A. P. 1997. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. Pp. 113–128 in T. D.

- Kocher and C. A. Stepien, eds. Molecular systematics of fishes. Academic Press, San Diego, CA.
- Brown, B.; Emberson, R. M.; Paterson, A. M. 1999. Mitochondrial COI and II provide useful markers for *Weiseana* (Lepidoptera, Hepialidae) species identification. *Bulletin of Entomological Research*, n. 89, p. 287-294.
- Bucklin, A.; Guarnieri, M.; Hill, R. S.; Bentley, A. M.; Kaartvedt, S. 1999. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiology*, n. 401, p. 239–254.
- Buitrago-Suárez, U. A.; Burr, B. M.; 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, n. 1512 p. 1-38.
- Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A. 2003. *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust/World Bank/IDRC, Victoria.
- Carvalho, D. C.; Oliveira, D. A. A.; Beheregaray, L. B.; Torres, R. A. 2012. Hidden genetic diversity and distinct evolutionarily significant units in an commercially important Neotropical apex predator, the catfish *Pseudoplatystoma corruscans*. *Conservation Genetics*. n. 6, v. 13, p. 1671-1675.
- Carvalho-Costa, L. F., Piorski, N. M., Willis, S. C., Galetti J. R. P. M., Ortí, G. 2011. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 59, n.1, p. 177-194.
- Castelnau, F. L. 1855. Poissons. In: Animaux Nouveaux or Rares Recueillis Pendant l'Expédition dans les Parties Centrales de l'Amérique du Sud de Rio de Janeiro a Lima, et de Lima au Para; Exécutée par ordre du Gouvernement Français Pendant les Années 1843 a 1847. Part 7, Zoology 2, i–xii + 1–112, 50 pls.
- Cooke, G. M.; Chao, N. L.; Beheregaray, L. B. 2012a. Divergent natural selection with gene flow along major environmental gradients in Amazonia: insights from genome scans, population genetics and Phylogeography of the characin fish *Triportheus albus*. *Molecular Ecology* n. 21, p. 2410-2427.
- Cooke, G. M.; Chao, N. L.; Beheregaray, L. B. 2012b. Natural selection in the water: freshwater invasion and adaptation by water colour in the Amazonian pufferfish. *Journal of Evolutionary Biology*. v. 25, i. 7, p. 1305-1320.
- Cooke, G. M.; Landguth, E. L.; Beheregaray, L. B. 2014. Riverscape genetics identifies replicated ecological divergence across an amazonian ecotone. *Evolution*. 68-7: 1947-1960.
- Coronel, J. S.; Maes, G. E.; Claus, S.; Van Damme, P. A.; Volckaert, F. A. M. 2004. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma*

flavicans and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *Journal of Fish Biology*, n. 65, p. 859-868.

Eigenmann, C. H.; Eigenmann, R. S.; 1889 Preliminary notes on South American Nematognathi II. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 2, 28–56.

Elliott, N. G.; Ward, R. D.; 1995. Genetic relationships of eight species of Pacific tunas (Teleostei, Scombridae) inferred from allozyme analysis. *Marine and Freshwater Research*. n. 46, p. 1021-1032.

Eschmeyer, W. N. (ed). Catalog of fishes: genera, species, references. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed 18/02/ 2020.

Farias, I. P.; Hrbek, T.; 2008. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. vol. 49, no. 1, p. 32–43.

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

Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*. n. 3, p. 294–299.

Formiga-Aquino, K. 2004. Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões. Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus, p. 73.

Frankham, R.; Ballou, J. D.; Briscoe, D. A. 2004. A Primer of Conservation Genetics - Cambridge University Press.

Fraser, D. J.; Bernatchez, L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*. n. 10, p. 2741-2752.

Funk, W. C.; McKay, J. K.; Paul, A. H.; Allendorf, F. W. 2012. Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology Evolution*. n.9, p. 489-496.

García-Dávila, C.; Duponchelle, F.; Castro-Ruiz, D.; Villacorta, J.; Quéroutil, S.; Chota-Macuyama, W.; Núñez, J.; Romer, U.; Carvajal-Vallejos, F.; Renno, J. F. 2013. Molecular identification of a cryptic species in the Amazonian predatory catfish genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1962) from Peru. *Genetica*, v. 141, i. 7-9, p. 347-358.

Garcia-Vazquez, E.; Horreo, J.L.; Campo, D.; Machado-Schiaffino, G.; Bista, I.; Triantafyllidis, A.; Juanes, F. 2009. Mislabeling of two commercial North

- American hake species suggests underreported exploitation of offshore hake. *Transactions of the American Fisheries Society*. n. 138, 790–796.
- Guerra, F. H.; Alcántara, B. M. G. J.; Sánchez, R. H. 1990. La Pesquería en el Amazonas Peruano. *Interciencia*, 15:469-475.
- Hausdorf, B., Wilkens, H., Strecker, U. 2011. Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei), *Molecular Phylogenetics and Evolution*. n. 60, 89-97.
- Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; Waard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. n. 270, p. 313-321.
- Hebert, P. D. N.; Stoeckle, M. Y.; Zemplak, T. S.; Francis, C. M. 2004. Identification of birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*., n. 2, v.10, p. 1567-1663.
- Henriques, J. M. 2010. Identificação Molecular (Dna Barcode) Dos Peixes Da Bacia Do Rio Ribeira De Iguape E Dos Rios Costeiros Do Estado De São Paulo. Dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Zoologia) UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP. Botucatu, SP.
- Hrbek, T.; Farias, I. P.; Crossa, M.; Sampaio, I.; Porto, J. I. R.; Meyer, A. 2005. Population Genetic Analysis of *Arapaima gigas*, one of the Largest Freshwater Fishes of the Amazon Basin: Implication for its Conservation. *Animal Conservation*. n. 8, p. 297-308.
- Hrbek, T., Crossa, M., Farias, I. P. 2007. Conservation Strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology*. n. 67, p. 909-917.
- Hubert, N.; Hanner, R.; Holm, E.; Mandrak, N. E.; Taylor, E.; Burrige, M.; Watkinson, D.; Dumont, P.; Curry, A.; Bentzen, P.; Zhang, J.; April, J.; Bernatchez, L. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *Plos One* n. 3, p. 2490.
- Huergo, G.M. 2009. Estimativa da diversidade genética da piraiá (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1919) e da piraiá negra (*B. capapretum* Lundberg & Akama, 2005), na Amazônia brasileira, inferidas através de DNA mitocondrial: subsídio para manejo e conservação. Tese de Doutorado, BADPI, INPA, Manaus,. 114 pp
- Jamielson, A. 1974. Genetic “ tags” for marine fish stocks. In: Harden Jones, F.R., (Ed.), Sea Fisheries Research. Paul Elek Scientific Books Ltd. London. pp. 91-99.
- Jarman, S. N.; Elliott, N. G. 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, living fossils’ from the Triassic. *Journal of Evolutionary Biology*. n. 13, p. 624-633.

- Junk, W. J. 1997. The Central Amazon Floodplain. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. n. 24, p.189–216.
- Larkin, P.A. 1972. The stock concept and management of Pacific salmon. H. R. MacMillan Lectures in fisheries, Univ. British Columbia. Vancouver.
- Lévêque, C.; Oberdorff, T.; Paugy, D.; Stiassny, M. L. J.; Tedesco, P. A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, n. 595, p. 545-567.
- Linnaeus, C. 1766. Systema Naturae Sive Regna Tria Natuare, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, Cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis. 12th ed., Vol. 1, pt. 1. Laurentii Salvii, Holmiae. 532 pp.
- Lira, A. C. 2013. Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra *Brachyplatystoma capapretum* (Siluriformes: Pimelodidae), por meio de marcadores mitocondriais e microsatélites. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, UFAM, Manaus,
- Lucas M. C.; Baras, E. 2001. Migration of freshwater fishes. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Lundberg, J. G.; Littmann, M. W. 2003. Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: Reis, R., Kullander, S.O. e Ferraris, C.J. Jr. (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, 432–455.
- Lundberg, J. G.; Sullivan, J. P.; Hardman, M. 2011. Phylogenetics of the South American Catfish Family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) using Nuclear and Mitochondrial Gene Sequences. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 161(1):153-189.
- Machado, V. N.; Willis, S. C. ; Teixeira, A. S. ; Hrbek, T. ; Farias, I. P. 2016. Population genetic structure of the Amazonian black flannelmouth characin (Characiformes, Prochilodontidae: *Prochilodus nigricans* Spix & Agassiz, 1829): contemporary and historical gene flow of a migratory and abundant fishery species. *Environmental Biology of Fishes*, v. online, p. 1.
- Manwell, C.; Baker, C. M. A. 1963. A sibling species of seacucumber discovered by starch-gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology*. n. 10, p. 39-53.
- Marques, A. A. B. et al. 2002. Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Decreto no 41.672, de 11 junho de Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGEA, 2002. 52p. (Publicações Avulsas FZB, 11).
- Meade, R. H.; Nordin, C. F. Jr.; Curtis, W. F.; Rodrigues, F. M. C.; Vale, C. M.; Edmond, J. M. 1979. Sediments Loads in Amazon River. *Nature*, 278:162-164.

- Mees, G. F. 1974. The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). *Zoologische Verhandelingen* (Leiden), n. 132: 1–256, pls. 1–15.
- Meyer, C. P.; Paulay, G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*. n. 3:e 422.
- Myers, R. A; Baum, J. K. Shepherd, T. D.; Powers, S.P.; Peterson, C. H. 2007. Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. *Science* 315:1846–1850
- Ochoa, L. E.; Pereira, L. H. G.; Costa-Silva, G. J.; Roxo, F. F.; Batista, J. S.; Formiga, K.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2015. Genetic structure and historical diversification of catfish *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with implications for its conservation. *Ecology and Evolution*. doi: 10.1002/ece3.1486
- Ortiz, Mauro de Freitas. 2010. Validação Do Dna Barcoding Como Identificador De Espécies: Um Estudo De Ampla Amostragem Com O Gênero Pseudoplatystoma (Siluriformes; Pimelodidae) Na Amazônia. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas com ênfase em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM.
- Pace, M. L.; Cole, J. J; Carpenter, S. R.; Kitchell, J. F. 1999. Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Trends Ecology and Evolution*. n. 14: 483–488.
- Passos, K. B. 2009. Genética populacional do jaraqui de escama grossa (*Semaprochilodus insignis* - Prochilodontidae, Characiformes). Diversidade Biológica Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Brasil.
- Pereira, L. H. G.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2009. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior-Ecology. *Freshwater Fish*, n. 18, p. 215–225.
- Pereira, L. H. G.; Hanner, R.; Foresti, F.; Oliveira C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, n.14, v.20.
- Petrere, J.R. M. 1995. A pesca de água doce no Brasil. *Ciênc. Hoje*, n.19, p. 28-33.
- Piggott, M. P.; Chao, N. L.; Beheregaray, L. B. 2011. Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. *Biological Journal of the Linnean Society*. n. 102, p. 391–403.
- Pullin, R. S. V. 2000. Management of aquatic biodiversity an genetic resources. *Reviews in Fisheries Science*, 8(4):379-393.
- Ramírez, G. H. 2001. Diferenciação genética de populações de Surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e de Caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*) nas

- bacias Magdalena, Orinoco e Amazonas. Tese de Doutorado. INPA/UFUA. Manaus. 114 p.
- Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. 2003. Check List of The Freshwater Fishes of South And Central America (CLOFFSCA), EDIOUCRS. Porto Alegre, 729p.
- Santos, G. M.; Efrem J. G. F.; Zuanon J. A. S. 2006. *Peixes comerciais de Manaus* – Manaus: Ibama/AM, ProVarzea p. 144.
- Santos, M. da C. F., T. Hrbek, & I. P. Farias, 2018. A Multilocus Approach to Understanding Historical and Contemporary Demography of the Keystone Floodplain Species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Frontiers in Genetics* 9: 17.
- Schmidt, G. W. 1982. Primary Production of Phytoplankton in Three Types of Amazonian Waters. Some Investigations on the Phytoplankton and its Primary Productivity in the Clear Water of the Lower Rio Tapajós, Pará (Brasil). *Amazoniana*, 7:335-348.
- Serra-Pereira, B.; Moura, T.; Griffiths, A.; Gordo, L.; Figueiredo, I. 2010. Molecular barcoding of skates (Chondrichthyes: Rajidae) from the southern Northeast Atlantic. *Zoologica Scripta*. n. 40: 76–84.
- Silva, T. J. 2009. Marcadores moleculares para análise da variabilidade genética de populações do aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*). Tese de Doutorado – UFAM, Manaus, p. 91.
- Sioli, H. 1967. Studies in Amazonian Water. Atlas do Simpósio sobre a Biota Amazônica, 3:9-50.
- Sioli, H. 1984. The amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses, and river types, p. 127-165. In: Sioli, H. (Ed.). The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin. Dr. W. Junk. Publishers, Dordrecht, South Holland.
- Smith, M. A.; Woodley, N. E.; Janzen, D. H.; Hallwachs, W.; Hebert, P. D. N. 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. v. 103, n. 10, p. 3657-3662.
- Sparre, P.; Venema, S. C. 1995. Introduccion a la evaluacion de recursos pesqueiros tropicales. Parte 1. Manual FAO Fisheries Technical Paper, N1 306.1, Ver. 1. Rome, 376p.
- Spruell, P.; Hemmingsen, A. R.; Howell, P. J.; Kanda, N.; Allendorf, F. W. 2003. Conservation genetics of bull trout: Geographic distribution of variation at microsatellite loci. *Conservation Genetics*. n. 4, p. 17-19.
- Steinke, D.; Zemplak, T. S.; Boutillier, J. A.; Hebert, P. D. N. 2009. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Marine Biology*. n. 156, p. 2641–2647.

- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Tree, London*, v.15, p.199-203.
- Tautz, D.; Arctander, P.; Minelli, A.; Thomas, R. H.; Vogler, A. P. 2002. DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature* v. 418, p. 479.
- Telles, M. P. C.; Collevatti, R. G.; Braga, R.S.; Guedes, L. B. S.; Castro, T. G.; Costa, M. C.; Silva-Júnior, N. J.; Barthém, R. B.; Diniz-Filho, J. A. F. 2014. Geographical genetics of *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) (Siluriformes, Pimelodidae) in the Amazon Basin. *Genetics and Molecular Research*, n. 13 v. 2: 3656-3666.
- Templeton, A. 2011. Genética de populações e teoria microevolutiva. Tradução de: Population genetics and microevolutionary theory. Editora SBG.
- Toffoli, D.; Hrbek, T.; Araujo, M. L. G.; Almeida, M. P.; Charvet-Almeida P, Farias, I. F. 2008. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics Molecular Biology*. n. 3, p. 324–336.
- Torrico, J. P.; Hubert, N.; Desmarais, E.; Duponchelle, F.; Rodriguez, J. N.; Montoya-Burgos, J. I.; Davila, C. G.; Carvajal-Vallejos, F. M.; Grajales, A. A.; Bonhomme, F.; Renno, J. F. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 51, p. 588–594.
- Trewick, S. A. 2000. Mitochondrial DNA sequences support allozyme evidence for cryptic radiation of New Zealand *Peripatoides* (Onychophora). *Molecular Ecology*. v. 9, p. 269–282.
- Turner, T. F.; McPhee, M. V.; Campbell, P.; Winemiller, K. O. 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology*. n. 64, p. 186-201.
- Vincent, S.; Vian, J.; M. Carlotti, M. P. 2000. Partial sequencing of the cytochrome oxidase-b subunit gene. I. A tool for the identification of European species of blow flies for post mortem interval estimation. *Journal of Forensic Sciences*. v. 45, p. 820–823.
- Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R.; Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. n. 360, p. 1847–1857.
- Welcomme, R. L. *River fisheries*. Roma: FAO, 1985. 330p. (FAO Fisheries Technical Papers, 262).
- Winemiller, K. O. 2005. Floodplain river food webs: generalizations and implications for fisheries management. In: Welcomme RL, Petr T (eds) Proceedings of the

Second International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries Phnom Penh. Mekong River Commission, Cambodia, pp 285–312.

Winemiller, K. O.; Jepsen, D. B. 1998. Effects of seasonality and fish movements on tropical river food webs. *Journal of Fish Biology*. 53:267–296.

Zapata, C. 1987. La varibilidad genética de las poblaciones In: Genética em acuicultura. Espinosa, M. e Labarta, U. (Ed). Plan de formación de técnicos superiores em acuicultura. Ind. Graf. Espana, Madrid.

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

1 **Capítulo 1: Delimitação de espécies-linhagens do gênero *Pseudoplatystoma***
2 **(Siluriformes: Pimelodidae) com base em marcadores do DNA mitocondrial**

3
4
5
6
7
8

Antonio Saulo Cunha-Machado^{1,4}; José Gregório Martínez^{2,3}; Izeni Pires Farias^{2,4};
Mauro de Freitas Ortiz^{4,5}; José Antônio Alves-Gomes^{4,6}; Tomas Hrbek^{2,4}; Kyara Martins Formiga^{1,4} and
Jacqueline da Silva Batista* ^{1,4}

9 ¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Biodiversidade (COBIO),
10 Coordenação de Pesquisas (COPEs), Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), Av. André
11 Araújo, 2936, CEP 69060- 001, Manaus, AM, Brazil.

12
13 ² Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Departamento de Genética, Laboratório de Evolução e
14 Genética Animal (LEGAL), Manaus, AM, Brazil.

15
16 ³ Grupo de Investigación Biociencias, Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio
17 Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia

18 ⁴ Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv), (INPA)
19 Manaus, AM, CEP 69011-970, Brazil.

20
21 ⁵ Instituto Federal Farroupilha, Campus Frederico Westphalen, Frederico Westphalen, RS, Brazil

22
23 ⁶ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Biodiversidade (COBIO),
24 Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), Laboratório de Fisiologia Comportamental e
25 Evolução (LFCE), Av. André Araújo, 2936, CEP 69060- 001, Manaus, AM, Brazil.

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 **Introdução**

51 Os peixes são organismos com maior biodiversidade entre os vertebrados,
52 representando mais de 30.000 espécies descritas, sendo que 43% das espécies (~13.000
53 espécies) ocorrem em ecossistemas de água doce (Lévêque et al., 2008; Nelson et al.,
54 2016). Infelizmente, as incertezas no um número exato de espécies, tem sido restrito a
55 espécies ainda não descritas e na descoberta de novas espécies. No entanto, isso tem
56 levado a inúmeras tentativas indiretas em responder a essa pergunta e ao mesmo tempo
57 gerado diversas controversas (Mora et al., 2011). Uma estimativa mais conservadora,
58 estima a existência de mais espécies desconhecidas, do que espécies conhecidas na terra
59 (Mora et al., 2011). No entanto, processo para determinar o que é uma espécie
60 (delimitação de espécie) requer um conceito de espécie associado, o que torna a questão
61 controversa (Cook et al., 2010). No mais básico, uma espécie pode ser 'um tipo
62 morfológico diferente de outros tipos' (Mayr, 1996). Para alguns taxonomistas, isso
63 pode ser suficiente, e tradicionalmente, o conceito morfológico de espécie foi um dos
64 mais utilizado e também aceito para a descrição de espécies de peixes e outros grupos.
65 No entanto, a delimitação de espécies com base em uma abordagem integrativa que
66 busca unir várias linhas de evidências biológicas (morfologia, genética, distribuição
67 geográfica, habitat ou comportamento) geralmente fornece hipóteses taxonômicas
68 robustas e consensuais (Dayrat, 2005; Padial et al., 2010). Para espécies de peixes
69 Amazônicos estudos de taxonomia integrativa utilizando informações genéticas e
70 morfológicas para delimitação e descrição de espécies vêm em uma crescente (Andrade
71 et al., 2017; Bernt et al., 2018; Escobar et al., 2019). No entanto, muitas espécies foram
72 descritas com base apenas em informações morfológicas, a exemplo das espécies do
73 gênero *Pseudoplatystoma*.

74 Durante muito tempo a riqueza de espécies do gênero foi subestimada, e apenas
75 três espécies eram reconhecidas: *P. fasciatum* (Linnaeus, 1766), *P. tigrinum*
76 (Valenciennes, 1840) e *P. corruscans* (Spix & Agassiz, 1829). Após revisão do gênero
77 realizada por Buitrago-Suárez & Burr (2007) (com base em análises morfológicas) ficou
78 estabelecida a ocorrência de oito espécies (morfo-espécies) sendo elas: *P. punctifer*
79 (com listras pretas) (Castelnau, 1855) e *P. tigrinum* (Valenciennes, 1840) simpátricas na
80 Bacia Amazônica; *P. metaense* e *P. orinocense* (Buitrago-Suárez & Burr, 2007)
81 simpátricos na Bacia do Orinoco; *P. corruscans* (Spix & Agassiz, 1829) e *P. reticulatum*
82 (Eigenmann & Eigenmann, 1889) simpátricas na bacia do Paraná-Paraguai (sendo que
83 *P. corruscans* também ocorre na bacia do São Francisco e *P. reticulatum* também ocorre

84 no rio Negro na bacia Amazônica). Já *P. magdaleniatum* (Buitrago-Suárez & Burr,
85 2007) é restrito à bacia de Magdalena e *P. fasciatum* com listras pretas) (Linnaeus,
86 1766) restrito aos rios do escudo da Guiana.

87 Uma prática comum para não taxonomistas é aplicar ferramentas moleculares
88 para identificar espécies já descritas (com base na morfologia). Torrico et al. (2009)
89 utilizando marcadores moleculares da DNA mitocondrial (região de controle e
90 citocromo b/Ctyb) validaram o estado taxonômico de *P. corruscans*, *P. reticulatum*
91 (Bacia Paraná/Paraguai), *P. tigrinum* e *P. magdaleniatum*. Surpreendentemente, as
92 sequências da região controle (CR) correspondentes a *P. metaense* e *P. orinocoense* da
93 bacia do Orinoco resultaram em um único clado, sem diferenciação entre essas duas
94 espécies morfologicamente distintas. No entanto, os próprios autores afirmam que
95 amostragens e análises complementares seriam necessárias para definir a relação entre
96 as duas espécies da Bacia do Orinoco. Da mesma forma, não foi possível diferenciar *P.*
97 *punctifer* (Amazônia) de *P. fasciatum* (Guyanas) à nível molecular. Carvalho-Costa et
98 al. (2011) com base em marcadores nucleares (Rag1 íntron 1 e S7 íntron 1) e
99 mitocondrial (citocromo b), reconheceram e recomendaram que o gênero fosse dividido
100 em apenas quatro espécies: *P. magdaleniatum*, *P. corruscans*, *P. tigrinum sensu lato* e
101 *P. fasciatum sensu lato*.

102 Usando sequências de região de controle García-Dávila et al. (2013)
103 identificaram dois clusters genéticos para *P. punctifer* na região de Iquitos no Peru. Os
104 espécimes representantes desses dois clusters genéticos também apresentam diferenças
105 no padrão de coloração corporal. Sendo que o cluster 1 com listras pretas pode
106 corresponder a *P. fasciatum* (Linnaeus, 1766), já o cluster 2 sem listras pode
107 corresponder a *P. punctifer* (Castelnau, 1855).

108 A questão taxonômica do gênero *Pseudoplatystoma* mostra-se complexa à
109 medida que estudos moleculares vêm sendo realizados (Torrico et al., 2009; Carvalho-
110 Costa et al., 2011; García-Dávila et al., 2013). No entanto, os resultados da região
111 controle (RC) do DNAm apresentaram clados bem suportados e mais próximos da
112 classificação das morfo-espécies de *Pseudoplatystoma* (Torrico et al., 2009; García-
113 Dávila et al., 2013).

114 O uso de marcadores moleculares na perspectiva de *DNA barcode* pode
115 compreender dois objetivos distintos: identificação de espécimes (molecular) e
116 descoberta de espécies (Schindel & Miller, 2005). A identificação de espécimes
117 (molecular) envolve a atribuição de nomes taxonômicos à amostras desconhecidas,

118 usando um banco de dados de referência de DNA, de vouchers morfolologicamente pré-
119 identificados (Collins & Cruickshank, 2013). A descoberta de espécies (species-
120 discovery) com base em marcadores moleculares, por outro lado, é mais bem pensada
121 como um processo de "parataxonomia molecular", análogo à classificação física de
122 amostras em morfo-espécies (Brower, 2006; Collins & Cruickshank, 2013). Nos casos
123 onde a descobertas de espécies-linhagens não forem condizentes com a taxonomia
124 existente, hipóteses baseadas nas sequências de DNA, poderão ser o ponto de partida
125 para uma revisão taxonômica de um grupo específico.

126 Os métodos de análises com dados de *locus* único como o GMYC (*generalized*
127 *mixed Yule coalescent*) (Fujisawa & Barraclough, 2013), bGMYC (implementação
128 bayesiana do GMYC) (Reid & Carstens, 2012) e mPTP (The Poisson tree process
129 method) (Kapli et al., 2017) fornecem agrupamentos significativos (clados ou linhagens
130 de mtDNA), próximos a espécies taxonomicamente reconhecidas e estão muito mais
131 próximos de uma perspectiva de descoberta de espécies-linhagens. Assim nos referimos
132 a eles como métodos de descoberta de espécies-linhagens de locus único.

133 Nesse sentido, o presente estudo pretende testar o COI e a RC como uma
134 ferramenta de avaliação da diversidade de espécies com base nos métodos de descoberta
135 de espécies-linhagens de locus único para o gênero *Pseudoplatystoma*. As hipóteses de
136 riqueza de espécies-linhagens foram estimadas independentemente dos nomes
137 taxonômicos e comparadas a posteriori com as espécies descritas taxonomicamente.

138 **Material e métodos**

139 *Amostragem e extração de DNA*

140 Amostras de tecido muscular de 976 indivíduos das espécies do gênero
141 *Pseudoplatystoma* foram coletadas entre os anos de 1998 a 2015 em 50 localidades em
142 30 rios, buscando abranger toda a área de distribuição do gênero na América do Sul. As
143 amostras foram depositadas na Coleção de Recursos Genéticos do Instituto Nacional de
144 Pesquisas da Amazônia (INPA) e na Coleção de Tecidos de Genética Animal da
145 Universidade Federal do Amazonas (CTGA/UFAM) Manaus, Brasil. Com a adição de
146 sequências do GenBank, obtivemos para as análises o total de 65 localidades de 35 rios
147 (Figura 1 e Tabela 1).

148 *Extração de DNA e amplificação do COI e RC*

149 As extrações de DNA foram realizadas de acordo com o protocolo de fenol-
150 clorofórmio/proteinase K (Sambrook & Russell, 2001). Os fragmentos do DNA
151 mitocondrial, citocromo oxidase subunidade 1 (COI) e região controle (RC) foram
152 amplificados por reação da polimerase em cadeia (PCR), usando os *primers* BOLCOI
153 F3: 5' TCA ACY AAT CAY AAA GAT ATY GGC CAC 3' e COI R3: 5' ACT TCY
154 GGG TGR CCR AAR AAT CA 3' (Ortiz, 2010); e FTTP - F: 5' CCA AGC GCC GGT
155 CTT GTA A - 3') (Batista, 2010) e F12-R: 5'-GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG -3'
156 (Sivasundar et al., 2001), respectivamente.

157 Para ambos os marcadores o volume total da PCR foi de 25 µL com 20 ng de
158 DNA, 1.5 mM MgCl₂, Tampão 1X, 200 µM dNTPs, 4 µM de cada *primer* e 2.5
159 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação do COI foi realizada
160 com as seguintes temperaturas: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por dois
161 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 40
162 segundos (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão) e um ciclo de extensão final a
163 72°C por 10 minutos. A amplificação da RC foi realizada com as seguintes
164 temperaturas: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por dois minutos, seguidos de 35
165 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 54°C por 40 segundos (anelamento) e
166 72°C por 1 minuto (extensão) e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. As
167 amplificações foram visualizadas em gel de agarose 1% com marcador de peso
168 molecular *Ladder* 1 Kb (Sinapse Biotecnologia).

169

170 *Purificação das PCRs e sequenciamento do DNA*

171 Todos os produtos das PCRs foram purificados via polietilenoglicol (PEG 8000
172 a 20% e NaCl 2,5M) as reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com
173 Platt et al., (2007) utilizado o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied
174 Biosystems). O sequenciamento foi realizado no analisador de DNA 3130xl *Genetic*
175 *Analyzer* (Applied Biosystems). Para edição das sequências dos dois marcadores foi
176 usado o programa *SeqScape® Software v2.7* (Applied Biosystems). Para o alinhamento
177 das sequências nucleotídicas foi utilizado o programa *Muscle* (Edgar, 2004).

178 *Delimitação de linhagens*

179 Os bancos de dados de sequências de DNA dos marcadores COI e RC foram
180 analisados separadamente com base na inferência filogenética bayesiana utilizando os
181 programas do pacote BEAST v2.5.2 (Bouckaert et al., 2019). Os bancos de dados foram
182 reduzidos e para as análises foram usadas as sequências dos haplótipos que foram
183 contabilizados como programa DNASP (Librado & Rozas, 2009). (Sequências idênticas
184 resultam em muitos ramos de comprimento zero na ponta da árvore e fazem com que o
185 modelo particione demais o conjunto de dados) (Reid & Carstens, 2012). O modelo de
186 substituição nucleotídica foi estimado (para cada gene) no programa PartitionFinder
187 v2.1.1 (Lanfear et al., 2017) com base no *Bayesian Information Criterion* (BIC). Os
188 modelos de substituição nucleotídica selecionados para o COI e RC foram o TN+I e
189 TN+I+G, respectivamente. Para ambos os bancos de dados foi considerado um relógio
190 molecular estrito com o *prior* da árvore Yule. Para o COI foi usado uma taxa de
191 substituição de 0.01 (arbitrária) e para a RC foi usada a taxa de 0,0062 (Torricco et al.,
192 2009). Para cada banco de dados foram conduzidas três corridas independentes de 20
193 milhões de gerações de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) com amostragem das
194 árvores a cada 18000 gerações, resultando em 3,333 árvores (das quais 333 foram
195 descartados como *burn-in*). Para verificar se as cadeias (MCMC) convergiram à
196 estacionariedade foi usado o programa Tracer v1.7 (Rambaut et al., 2018). Os valores
197 de ESS (*effective sample sizes*) > 200 indicaram a convergência e estacionariedade das
198 cadeias. As 3000 árvores geradas, foram combinadas no programa LogCombiner e
199 sumarizadas pelo método *maximum clade credibility* (MCC) *tree* no programa
200 TreeAnnotator (ambos programas do pacote BEAST v 2.5.2).

201 A identificação das linhagens genéticas foram realizadas com base em três
202 métodos de análises com dados de *locus* único: o GMYC (*generalized mixed Yule*
203 *coalescent*) (Fujisawa & Barraclough, 2013), bGMYC (implementação bayesiana do
204 GMYC) (Reid & Carstens, 2012) e mPTP (The Poisson tree process method) (Kapli et
205 al., 2017). Como *input* das análises GMYC e bGMYC foi utilizada a *maximum clade*
206 *credibility* (MCC) *tree*. As análises foram conduzidas no programa R v. 3.6.0 (R Core
207 Team, 2019). Os pacotes utilizados foram: bGMYC_1.0.2 (Reid & Carstens, 2012),
208 splits_1.0-19 (Fujisawa & Barraclough, 2013) e ape_5.0 (Paradis et al., 2004). Como
209 *input* para o mPTP foi usada uma árvore Maximum Likelihood gerada no programa
210 RaxML v. 8 (Stamatakis, 2014) e posteriormente submetida para a análise na web page

211 <https://mptp.h-its.org>. Os resultados das três análises de delimitação foram sumarizadas
212 e visualizadas usando ggtree (Yu et al., 2017), também implementado no R.

213 Para as linhagens genéticas delimitadas pelos métodos GMYC e bGMYC
214 foram estimados as distâncias genéticas com base no modelo de distância Tamura-Nei
215 (TN93) (Tamura & Nei, 1993) e Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) com
216 suporte de *bootstrap* com 1000 replicações no programa MEGA X (Kumar et al., 2018).

217 Realizamos também uma PCA (*Principal Coordinates Analysis*) para o banco
218 de dados do COI e RC usando o pacote do R, *spider_1.5.0* com a função *ordinDNA*
219 (Brown et al., 2012). Na PCA a distância entre os dois aglomerados é aproximadamente
220 proporcional às distâncias genéticas entre as espécies.

221

222 Resultados

223 Foram recuperadas sequências para as 8 morfo-espécies do gênero
224 *Pseudoplatystoma*. Para o COI foram sequenciadas 976 amostras e adicionadas 42
225 sequências do genbank (Carvalho et al., 2011, 2012; Pereira et al., 2013), totalizando
226 1018 sequências (Tabela 1). Foram observados 67 haplótipos, 94 sítios polimórficos, 74
227 sítios informativos (parcimônia).

228 Para a RC foram sequenciadas 468 amostras e adicionadas 211 sequências do
229 genbank (Torricco et al., 2009; García-Dávila et al., 2013), totalizando 679 sequências
230 (Tabela 1). Foram observados 339 haplótipos, com o total de 230 sítios polimórficos
231 (162 sítios informativos parcimônia e 68 sítios com polimorfismo único) 18 gaps e 607
232 sítios monomórficos totalizando 855 sítios analisados.

233 Com base no COI, as três análises de delimitação de linhagens (GMYC,
234 bGMYC e mPTP) foram congruentes e recuperaram 5 espécies-linhagens, todas com
235 valores de probabilidade posterior > 95% (Figura 2), mas não tiveram correspondência
236 com as 8 morfo-espécies. Sendo que *P. punctifer* agrupou junto com *P. reticulatum* da
237 bacia do Paraná Paraguai (Azul). *P. tigrinum* agrupou junto com *P. metaense* (verde). *P.*
238 *reticulatum* do rio Negro agrupou junto com *P. orinocoense* (roxo). Apenas *P.*
239 *corruscans* (vermelho) e *P. magdaleniatum* (amarelo) não agruparam com outras
240 morfo-espécies (Figura 2).

241 Para a RC, duas análises de delimitação de linhagens (GMYC e bGMYC)
242 recuperaram 9 espécies-linhagens (Figura 3). Sendo que *P. punctifer* agrupou junto com
243 *P. fasciatum* e *P. punctifer* com listras pretas (cluster 1 García-Dávila et al., 2013) (azul).
244 *P. punctifer* agrupou junto com *P. punctifer* sem listras pretas (cluster 2 García-Dávila

245 et al., 2013) (cinza). *P. reticulatum* da bacia do Paraná-Paraguai (azul escuro) não
246 agrupou com outra morfo-espécie, no entanto, não teve relação com *P. reticulatum* do
247 rio Negro, que agrupou junto com *P. orinocoense* (roxo) (Figura 3). A grande maioria
248 das amostras de *P. tigrinum* não agrupou com outra morfo-espécie (verde escuro). No
249 entanto, algumas amostras de *P. tigrinum* agruparam com *P. metaense* (verde claro)
250 (Figura 3). *P. corruscans* separou em duas linhagens uma da bacia do Paraná-Paraguai
251 (marrom) e outra da bacia do São Francisco (vermelho). *P. magdaleniatum* (amarelo)
252 não agruparam com outras morfo-espécies (Figura 3).

253 Já o mPTP recuperou 6 espécies-linhagens (Figura 3). Agrupou *P. punctifer*
254 (sem listras pretas); *P. fasciatum* (com listras pretas) e *P. reticulatum* da bacia do
255 Paraná-Paraguai (azul claro) (Figura 3). *P. reticulatum* do rio Negro agrupou junto com
256 *P. orinocoense* (roxo). *P. tigrinum* agrupou junto com *P. metaense* (verde escuro). *P.*
257 *corruscans* separou em duas linhagens uma da bacia do Paraná-Paraguai (marrom) e
258 outra da bacia do São Francisco (vermelho) e por último *P. magdaleniatum* (amarelo)
259 (Figura 3).

260 As distâncias genéticas estimadas com base nos modelos Tamura-Nei (TN93) e
261 Kimura-2-parâmetros (K2P), não tiveram diferenças significativas, por tanto,
262 apresentamos as distâncias Tamura-Nei (TN93). A maior distância genética (TN93)
263 para o COI foi de 9% (*P. magdaleniatum* x *P. tigrinum*) e a menor foi de 2,2% (*P.*
264 *reticulatum* x *P. tigrinum*) (Tabela 2). Para a RC a maior distância genética (TN93) foi
265 de 7.9% entre *P. reticulatum* da bacia do Paraná-Paraguai com *P. corruscans* da bacia
266 do São Francisco. A menor distancia foi de 1.3% observada entre *P. reticulatum* da
267 bacia do Paraná-Paraguai com *P. punctifer* (com listras pretas); e entre *P. tigrinum* e *P.*
268 *metaense* (Tabela 3).

269 O PCA do COI também foi possível observar 5 agrupamentos (Figura 4a) que
270 foram congruentes com as 5 espécies-linhagens (Figura 2). Já para o PCA da RC foi
271 possível observar 7 agrupamentos (Figura 4b). Sendo que as espécies-linhagens
272 referente a *P. metaense* e *P. tigrinum*; ficaram parcialmente sobrepostos, e as espécies-
273 linhagens referente a *P. punctifer* (com listras pretas) e *P. reticulatum* (do
274 Paraná/Paraguai) também ficaram sobrepostos no PCA (Figura 4b).

275

276 **Discussão**

277 Assumindo que quanto mais próxima a delimitação de linhagens genéticas
278 estiverem da taxonomia atual, maior a probabilidade de corresponder as espécies reais.
279 Obtivemos maior precisão relativa com o uso da RC e com base nos métodos GMYC e
280 bGMYC, onde foram delimitadas 9 espécies-linhagens, das 8 morfo-espécies descritas
281 para o gênero *Pseudoplatystoma*. Como já foi observado em muitos outros estudos de
282 biodiversidade molecular, o número de espécies-linhagens delimitadas geralmente
283 excede o número de táxons nominais ou mesmo morfo-espécies analisadas (Machado et
284 al., 2018; Carvalho et al., 2019).

285 *P. magdaleniatum* foi a única espécie que foi recuperada por todos os
286 marcadores (COI e RC) e métodos analisados (GMYC, bGMYC, mPTP e PCA) a e
287 exemplo do que foi encontrado em estudos prévios (Torrico et al., 2009; Carvalho-
288 Costa et al., 2011). As análises moleculares confirmam o status taxonômico dessa
289 espécie, que foi descrita apenas com dados morfológicos e que alguns casos os mesmos
290 podem ser suficientes, para a descrição de uma espécie. No entanto para as demais
291 espécies do gênero os caracteres morfológicos usados para a separação e classificação
292 taxonômica precisam ser reavaliados.

293 Para *P. corruscans*, todos os métodos (mPTP, bGMYC, GMYC e PCA) com
294 base na RC recuperaram duas espécies-linhagens, uma da bacia do Paraná-Paraguai e
295 outra da bacia do São Francisco com distância genética de 3,3% (Tabela 3). Duas
296 linhagens genéticas já haviam sido identificadas por análises de microssatélites e do gene
297 COI para *P. corruscans* (Carvalho et al., 2012). Apesar de nossas análises com COI não
298 terem separado as duas linhagens os valores de probabilidade posterior de suporte do
299 clados foram > 95%, maiores que haviam sido observados por Carvalho et al. (2012) na
300 mesma área de estudo (maior valor de probabilidade posterior = 85%).

301 Todas as amostras de *P. metaense* ficaram em um único clado. No entanto, sete
302 amostras de *P. tigrinum* agruparam no clado de *P. metaense* (4 amostras de Iquitos e 3
303 do rio Madeira, PV4 e 3 e HM3) (Fig. 3). Esse pode ser mais um caso de introgressão
304 do DNA mitocondrial, que já foi relatado para espécies de *Pseudoplatystoma* em
305 análises com o a região controle (García-Dávila et al., 2013). As demais amostras de *P.*
306 *tigrinum* como o esperado agruparam em um único clado e não agruparam amostras de
307 *P. metaense*. Vale destacar que a distância genética (RC) entre esses dois clados foi de
308 apenas de 1,3% e o PCA separou parcialmente essas duas espécies-linhagens. Essas
309 duas espécies podem ter divergência recente, o que pode explicar a baixa distância

310 genética e os haplótipos compartilhados. Apesar de todas as espécies do gênero
311 apresentar $2n=56$, foi observado que existem algumas diferenças cromossômicas entre
312 *P. metaense* (bacia do Orinoco) e *P. tigrinum* (rio Solimões bacia Amazônica)
313 (Fenocchio & Bertollo, 1992; Nirchio et al., 2013). Foi observado também com base em
314 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism markers, 371 loci 207.294 pb) que *P. metaense*
315 e *P. tigrinum* possuem diferenças nas frequências alélicas e composição genômica
316 independente (Martínez, 2015).

317 As amostras de *P. reticulatum* do rio Negro na bacia Amazônica agruparam em
318 uma única linhagem, juntamente com *P. orinocoense* da bacia do Orinoco, tanto com a
319 RC e com o COI para todos os métodos analisados. Para a revisão morfológica do
320 gênero não foram realizadas coletas no Rio Negro (bacia Amazônica, Brasil) localidade
321 tipo de *P. reticulatum*. Por esse motivo erroneamente podem ter separado *P.*
322 *orinocoense* de *P. reticulatum* (Buitrago-Suárez & Burr, 2007) que podem corresponder
323 a mesma espécie morfológica. Apesar do padrão de coloração corporal não ser um forte
324 caractere, o mesmo também é utilizado para a separação das espécies e pode ser
325 importante na ausência de um especialista. Buitrago-Suárez & Burr (2007) apresentam
326 dois padrões de coloração para *P. reticulatum*, sendo que cor reticulada definida por eles
327 como padrão da espécie é diferente do holótipo (por eles mesmo apresentados). Na
328 chave de identificação para *P. reticulatum* é definido como cor padrão da espécie,
329 barras ou reticuladas grossas ao lado do corpo (espécime da bacia do Paraná-Paraguai)
330 (Buitrago-Suárez & Burr, 2007). Porém, tanto o holótipo quanto as amostras do rio
331 Negro analisadas no presente estudo apresentaram barras ou reticuladas finas no lado do
332 corpo. As filogenias com base nos marcadores Cytb e Rag1int1 analisados
333 separadamente mostram um clado para as amostras de *P. orinocoense* exclusivo para
334 amostras do Orinoco (não amostraram no Rio Negro) (Carvalho-Costa et al., 2011). No
335 entanto, três amostras coletadas próximo ao canal do Rio Casiquiare que foram
336 nomeadas como *P. orinocoense* agruparam no clado de *P. punctifer* (nomeados de *P.*
337 *fasciatum sensu lato*). A identificação incorreta das amostras foi descartada pelos
338 autores, pelo fato de *P. orinocoense* ser endêmico da bacia do Orinoco (Carvalho-Costa
339 et al., 2011). Mas destacamos que *P. punctifer* (com listras pretas) também ocorre no
340 alto rio Negro (São Gabriel) que fica próximo do Rio Casiquiare, acreditamos que essa
341 espécie também pode ocorrer nessa região da bacia do Orinoco, até pela sua capacidade
342 de dispersão (Hahn et al., 2019). A falha na separação dessa espécie na análise de
343 árvores de espécies da sistemática molecular (Carvalho-Costa et al., 2011) pode estar

344 relacionado ao agrupamento de amostras de *P. punctifer* como sendo *P. orinocoense*, e
345 ao uso um marcador (S7 gene ribossomal, na análise concatenada) que não foi eficiente
346 em separar essas duas espécies.

347 Por outro lado, as amostras de *P. reticulatum* da Bacia do Paraná-Paraguai
348 agruparam em um único clado e não apresentaram relação com *P. reticulatum*/*P.*
349 *orinocoense* do rio Negro e Orinoco (Fig. 3). Sendo que a distância genética entre as
350 mesmas foi de 4,4% (RC) (Tabela 3). A localidade tipo de *P. reticulatum* é o rio Negro
351 (Bacia Amazônica, Brasil). No entanto, na revisão do gênero a distribuição dessa
352 espécie foi expandida do rio Negro (bacia Amazônica) para bacia do Paraná-Paraguai
353 (Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai) e essa expansão da distribuição não foi
354 explicada.

355 *P. reticulatum* da Bacia do Paraná-Paraguai está mais próximo de *P. punctifer*
356 (com listras pretas) com a distância genética de 1,3% (Tabela 3). Apesar de dois
357 métodos de delimitação terem separados essas duas espécies-linhagens, essa
358 proximidade genética pode ser evidenciada no PCA, onde as mesmas ficaram
359 sobrepostas (Fig. 4B). Essa separação de *P. punctifer* (com listras pretas) para *P.*
360 *reticulatum* da Bacia do Paraná-Paraguai tinha sido encontrada por Torrico et al. (2009),
361 onde também apresentaram uma baixa distância genética de 1,4%. Essa menor distância
362 genéticas pode estar relacionada com a divergência recente entre essas espécies que foi
363 estimada em ~ 800 mil anos atrás (Torrico et al., 2009). A especiação entre essas duas
364 espécies foi relacionada a eventos desconhecidos (Torrico et al., 2009). Mas a
365 divergência entre as espécies também pode estar relacionado com o comportamento
366 migratório parcial (com indivíduos residentes e migratórios de média distância) (Hahn
367 et al., 2019). Apesar de existirem rotas de migração entre a bacia Amazônica com a
368 bacia do Paraná-Paraguai, vem sendo observado que as espécies não migram longas
369 distâncias e são geneticamente diferenciadas dentro de cada bacia onde ocorrem (De
370 Abreu et al., 2009; Hahn et al., 2019).

371 Da mesma forma que observado por um estudo prévio *P. fasciatum* (das
372 Guianas) agrupou junto com *P. punctifer* (com listras pretas) (Torrico et al., 2009). *P.*
373 *fasciatum* e *P. punctifer* (com listras pretas) apresentaram o padrão de coloração
374 corporal e anatomia semelhantes (cabeça e corpo) (Buitrago-Suárez & Burr, 2007). Na
375 PCA com base em caracteres morfológicos não foi eficiente em separar os espécimes
376 das Guianas e bacia Amazônica, mesmo assim foram separadas em duas espécies
377 (Buitrago-Suárez & Burr, 2007). Com base nas informações genéticas (do presente

estudo e de estudos prévios) e morfológicas (Buitrago-Suárez & Burr, 2007) podemos afirmar que *P. fasciatum* e *P. punctifer* (com listras pretas) se tratam de uma única espécie, que pode ser considerada a descrição original de Linnaeus (1766) (*P. fasciatum*).

Supreendentemente, encontramos dois clados para *P. punctifer* (com e sem listras pretas) ocorrendo em simpatria em praticamente toda a bacia Amazônica, com uma distância genética de 2,1% (Tabela 3). Essa distância é maior do que foi observada entre *P. tigrinum* e *P. metaense* e entre *P. punctifer* (com listras pretas) e *P. reticulatum* do Paraná-Paraguai (espécies que ocorrem em bacias distintas) (Tabela 3). Na PCA os agrupamentos (*P. punctifer* com e sem listras pretas) ficaram próximos (Fig. 4B), mas não sobrepostos como observados para outras espécies. Esses dois clados apresentam também diferenças no padrão de coloração corporal, um com listras pretas e outro sem listras pretas, que podem corresponder aos originalmente descritos *P. fasciatum* (Linnaeus, 1766) e *P. punctifer* (Castelnau, 1855), respectivamente. Na revisão do gênero é apresentada a ilustração original da descrição de *P. punctifer* que também não apresenta listras pretas, mas o padrão de coloração é relacionado a outra imagem que apresenta um espécime com listras pretas (Buitrago-Suárez & Burr, 2007). Espécimes com esse mesmo fenótipo (sem listras pretas) já haviam sido registrados na região de Iquitos (Peru), onde também a hipótese de serem espécies distintas também foi considerada (García-Dávila et al., 2013). Com base em análises da RC e microssatélites foi possível separar esses dois morfotipos (García-Dávila et al., 2013). No entanto, alguns haplótipos foram compartilhados entre os fenótipos, do clado sem listras pretas com o clado dos espécimes predominantemente com listras pretas (García-Dávila et al., 2013), o que também foi observado no presente trabalho. Isso também pode ser explicado retenção do polimorfismo ancestral ou introgressão do mtDNA, levando em consideração a possível especiação mais recente, não só para essas duas espécies-linhagens. Mas também entre *P. tigrinum* e *P. metaense* que também compartilharam haplótipos, e para *P. punctifer* com listras pretas com *P. reticulatum* do Paraná-Paraguai, que não compartilharam haplótipos, mas apresentou uma menor distância genética. Apesar de não ter sido considerado pelos autores, a hibridização pode estar ocorrendo, visto que 2 indivíduos com listras pretas foram designados ao grupo sem listras pretas e 1 indivíduo do grupo sem listras pretas foi atribuído ao grupo com listras pretas (García-Dávila et al., 2013).

411 García-Dávila et al. (2013) apresentam uma possível área de distribuição para
412 *P. punctifer* sem listras pretas, com base em informação pessoal e de outros autores
413 (visto que as análises foram realizadas apenas com amostras da região de Iquitos no
414 Peru). No presente trabalho foi possível inserir uma grande amostragem da bacia
415 amazônica e ter uma real noção da distribuição da espécie. Onde foi possível confirmar
416 sua ocorrência no Rio Negro (Manaus) e no rio Amazonas (Santarém) (informações de
417 García-Dávila et al., 2013). Também foi possível realizar novos registros de espécies no
418 Rio Purus (Boca do Acre e Lábrea), Rio Solimões (Tefé), Rio Madeira (Humaitá), Rio
419 Iriri, Rio Xingu, Rio Tapajós (Itaituba e Jacareacanga), Rio Negro (São Gabriel) e Rio
420 Amazonas (Oriximiná). Não registramos a ocorrência de *P. punctifer* sem listras pretas
421 acima das corredeiras do rio Madeira (Mamoré/Guaporé) confirmando informações de
422 García-Dávila et al., (2013).

423 As espécies de *Pseudoplatystoma* que ocorrem na bacia amazônica podem ter
424 divergido através da especiação ecológica. *P. reticulatum*/*P. orinocoense* pode ter se
425 adaptado as águas pretas do rio Negro e as condições climáticas da bacia do Orinoco.
426 Visto que não houve diferenças significantes entre valores de pH da água onde habitam
427 peixes sedentários, obtidos de 26 pontos entre as bacias do Orinoco e Negro (pH de 4,78
428 $\pm$ 0,46 e 4,54 $\pm$ 0,60, respectivamente) (Martínez, 2015). Algumas espécies de
429 *Pseudoplatystoma* são residentes (sedentária) (Godinho et al., 2007; Hahn et al., 2019).
430 Entre os pontos analisados com pH ácido da bacia do Orinoco, estão algumas
431 localidades que foram amostradas no presente trabalho (Puerto Carreño, Puerto Inírida e
432 Guaviare) (Martínez, 2015). *P. tigrinum* e *P. punctifer* com listras pretas são conhecidos
433 por terem diferentes requisitos de habitat: o primeiro é mais frequente em ambientes
434 abertos e lênticos, enquanto o segundo se favorece condições lóticas estruturadas (com
435 toras e galhos de madeira e área de vegetação) (Reid, 1983; Loubens & Panfili, 2000;
436 García-Dávila et al., 2013). Já *P. punctifer* sem listras pretas tem preferencias por
437 bancos arenosos ou enlameados dos canais dos rios de água branca (Garcia-Dávila).
438 Nossas análises revelou maior frequência de indivíduos dessa linhagem em rios de
439 águas claras, onde bancos de areia são mais frequentes.

440 O mPTP recuperou apenas 6 clados, agrupou em um único clado *P. punctifer*
441 (com e sem listras pretas) e *P. reticulatum* da Paraná-Paraguai; e *P. tigrinum* com *P.*
442 *metaense*. Vem sendo observado que o mPTP tem sido o método que delimita o menor
443 número de espécies-linhagem para espécies de peixes amazônicos, com relação a outros
444 métodos (Machado et al., 2018; Carvalho et al., 2019). Em alguns casos mPTP não

445 conseguiu distinguir vários pares de espécies irmãs que são facilmente reconhecíveis
446 pela morfologia.

447 Todos os outros marcadores moleculares de sequências (Cytb, COI, Rag1int1 e
448 S7int1) (García-Dávila et al., 2013; Carvalho-Costa et al., 2011) usados até o momento
449 apresentaram menor variabilidade genética em comparação a região controle.
450 Provavelmente isso explica a incapacidade dos mesmos em separar as linhagens-
451 espécies de *Pseudoplatystoma* evidenciadas pela topologia da árvore da RC com os
452 métodos bGMYC e GMYC (Fig. 3). O tamanho efetivo populacional (N_e) de alguns loci
453 (particularmente aqueles do mtDNA codificadores de proteínas) ou diferentes padrões
454 de seleção podem levar alguns loci a atingirem monofilia recíproca mais cedo do que
455 outros (Di Candia & Routman, 2007). Isso pode explicar da região controle delimitar
456 melhor espécies-linhagens do que os locos autossômicos ou genes mitocondriais
457 codificadores de proteínas para o gênero *Pseudoplatystoma*. Tais dificuldades
458 associadas aos marcadores que não conseguiram separar as espécies evidenciam a
459 necessidade de considerar a região controle para futuros estudos de *Pseudoplatystoma*,
460 além do uso de marcadores microssatélites diagnósticos e SNPs. O uso de marcadores
461 moleculares não deve ser a única linha de evidência usada para tirar conclusões
462 taxonômicas (DeSalle et al., 2005), assim como apenas caracteres morfológico para
463 ditar mudanças sistemáticas é desaconselhável (Will et al., 2005). Porém, o uso de
464 marcadores moleculares pode ser o primeiro passo para descoberta de espécies de
465 espécies-linhagens anteriormente negligenciadas, fornecendo um roteiro para grupos de
466 táxons que precisam de um estudo mais completo.

467 Diferentemente da sistemática molecular que voltou a subestimar a riqueza de
468 *Pseudoplatystoma* (Carvalho-Costa et al., 2011). Nossos resultados de delimitação de
469 espécies-linhagens de locus único sustentam a diversidade taxonômica do gênero
470 revelando nove espécies-linhagens. Até que estudos de taxonomia integrativa sejam
471 realizados para definição dos status taxonômicos das espécies de *Pseudoplatystoma*,
472 sugerimos que as medidas de conservação (caso necessárias) sejam realizadas de forma
473 independente para essas nove espécies-linhagens identificadas no presente estudo.
474 Destacamos também que seja dada a devida atenção para *P. punctifer* sem listras pretas,
475 visto que essa morfo-espécie não é diferenciada nos dados de estatística pesqueira, e que
476 também pode estar sofrendo impacto da pesca visto que é menos abundante que *P.*
477 *punctifer* com listras pretas e *P. tigrinum* na bacia amazônica Brasileira.

478

Referências

- Andrade, M. C., V. N. Machado, M. Jégu, I. P. Farias, & T. Giarizzo, 2017. A new species of *Tometes Valenciennes* 1850 (Characiformes: Serrasalminidae) from Tocantins-Araguaia River Basin based on integrative analysis of molecular and morphological data. *PLOS ONE* 12: 1–21.
- Batista, J. S., 2010. Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo. PhD Thesis. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus (AM), Brasil. , Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA , Manaus (AM), Brasil.
- Bernt, M. J., W. G. R. Crampton, A. B. Orfinger, & J. S. Albert, 2018. *Melanosternarchus amaru*, a new genus and species of electric ghost knifefish (Gymnotiformes: Apterontidae) from the Amazon Basin. *Zootaxa* 4378: 451, <https://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.4378.4.1>.
- Bouckaert, R., T. G. Vaughan, J. Barido-Sottani, S. Duchêne, M. Fourment, A. Gavryushkina, J. Heled, G. Jones, D. Kühnert, N. De Maio, M. Matschiner, F. K. Mendes, N. F. Müller, H. A. Ogilvie, L. du Plessis, A. Popinga, A. Rambaut, D. Rasmussen, I. Siveroni, M. A. Suchard, C. H. Wu, D. Xie, C. Zhang, T. Stadler, & A. J. Drummond, 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology* .
- Brower, A. V. Z., 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: ‘Ten species’ of *Astrartes fulgurator* reassessed (Lepidoptera: Hesperidae). *Systematics and Biodiversity* 4: 127–132.
- Brown, S. D. J., R. A. Collins, S. Boyer, M.-C. Lefort, J. Malumbres-Olarte, C. J. Vink, & R. H. Cruickshank, 2012. Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 12: 562–565,
- Buitrago-Suárez, A. U., & B. M. Burr, 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa* 1512: 1–38.
- Carvalho-Costa, L. F., N. M. Piorski, S. C. Willis, P. M. Galetti, & G. Ortí, 2011. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Elsevier Inc. 59: 177–194.
- Carvalho, A. P. C., R. A. Collins, J. G. Martínez, I. P. Farias, & T. Hrbek, 2019. From shallow to deep divergences: mixed messages from Amazon Basin cichlids. *Hydrobiologia* 832: 317–329.
- Carvalho, D. C., D. A. A. Oliveira, L. B. Beheregaray, & R. A. Torres, 2012. Hidden genetic diversity and distinct evolutionarily significant units in an commercially important Neotropical apex predator, the catfish *Pseudoplatystoma corruscans*. *Conservation Genetics* 13: 1671–1675.

- Carvalho, D. C., D. A. A. Oliveira, P. S. Pompeu, C. G. Leal, C. Oliveira, & R. Hanner, 2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA* 22: 80–86.
- Collins, R. A., & R. H. Cruickshank, 2013. The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 13: 969–975.
- Cook, L. G., R. D. Edwards, M. D. Crisp, & N. B. Hardy, 2010. Need morphology always be required for new species descriptions?. *Invertebrate Systematics* 24: 322–326.
- Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- De Abreu, M. M., L. H. G. Pereira, V. B. Vila, F. Foresti, & C. Oliveira, 2009. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. *Genetics and Molecular Biology* 32: 868–873.
- DeSalle, R., M. G. Egan, & M. Siddall, 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1905–1916.
- Di Candia, M. R., & E. J. Routman, 2007. Cytonuclear discordance across a leopard frog contact zone. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 564–575.
- Edgar, R. C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Escobar, M. D. L., R. P. Ota, A. Machado-Allison, J. Andrade-López, I. P. Farias, & T. Hrbek, 2019. A new species of *Piaractus* (Characiformes: Serrasalminae) from the Orinoco Basin with a redescription of *Piaractus brachipomus*. *Journal of Fish Biology* 95: 411–427.
- Fenocchio, A. S., & L. A. Bertollo, 1992. Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian amazon region. *Cytobios* 69: 41–46.
- Fujisawa, T., & T. G. Barraclough, 2013. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Systematic Biology* 62: 707–724.
- García-Dávila, C., F. Duponchelle, D. Castro-Ruiz, J. Villacorta, S. Quéroutil, W. Chota-Macuyama, J. Núñez, U. Römer, F. Carvajal-Vallejos, & J. F. Renno, 2013. Molecular identification of a cryptic species in the Amazonian predatory catfish genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1962) from Peru. *Genetica* 141: 347–358.
- Godinho, A. L., B. Kynard, & H. P. Godinho, 2007. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environmental Biology of Fishes* 80: 421–433.
- Hahn, L., E. G. Martins, L. D. Nunes, L. F. da Câmara, L. S. Machado, & D. Garrone-Neto, 2019. Biotelemetry reveals migratory behaviour of large catfish in the Xingu River, Eastern Amazon. *Scientific Reports* 9: 1–15.
- Kapli, P., S. Lutteropp, J. Zhang, K. Kobert, P. Pavlidis, A. Stamatakis, & T. Flouri,

2017. Multi-rate Poisson Tree Processes for single-locus species delimitation under Maximum Likelihood and Markov Chain Monte Carlo. *Bioinformatics* 33: 1630–1638.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* Springer 16: 111–120.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, & K. Tamura, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549.
- Lanfear, R., P. B. Frandsen, A. M. Wright, T. Senfeld, & B. Calcott, 2017. PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution* 34: 772–773.
- Lévêque, C., T. Oberdorff, D. Paugy, M. L. J. Stiassny, & P. a. Tedesco, 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 545–567.
- Librado, P., & J. Rozas, 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Loubens, G., & J. Panfili, 2000. Biologie de *Pseudoplatystoma fasciatum* et *P. tigrinum* (Teleostei: Pimelodidae) dans le bassin du Mamoré. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 11: 13–34.
- Machado, V. N., R. A. Collins, R. P. Ota, M. C. Andrade, I. P. Farias, & T. Hrbek, 2018. One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. *Scientific Reports* Springer
- Martínez, J. G., 2015. Desvendando processos atuais e históricos dos peixes migradores e sedentários: Uma abordagem genômica, filogeográfica e genético-populacional entre as bacias do Orinoco e Amazonas. Universidade Federal do Amazonas, <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/4836>.
- Mayr, E., 1996. What Is a Species, and What Is Not?. *Philosophy of Science* 63: 262–277.
- Mora, C., D. P. Tittensor, S. Adl, A. G. B. Simpson, & B. Worm, 2011. How many species are there on earth and in the ocean?. *PLoS Biology* 9: 1–8.
- Nelson, J. S., T. C. Grande, & M. V. H. Wilson, 2016. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA.
- Nirchio, M., A. Mujica, C. Oliveira, A. Granado, J. Mora, A. K. Hett, A. R. Rossi, V. Milana, & L. Sola, 2013. *Pseudoplatystoma metaense* and *P. orinocoense* (Siluriformes: Pimelodidae) from the Orinoco basin, Venezuela: cytogenetic and molecular analyses. *Italian Journal of Zoology* 80: 526–535.
- Ortiz, M. F., 2010. Validação Do Dna Barcoding Como Identificador De Espécies: Um Estudo De Ampla Amostragem Com O Gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes; Pimelodidae) Na Amazônia. M.Sc. Thesis. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, (AM), Brasil. .

- Padial, J. M., A. Miralles, I. De la Riva, & M. Vences, 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7: 16.
- Paradis, E., J. Claude, & K. Strimmer, 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289–290, <https://academic.oup.com/bioinformatics/articlelookup/doi/10.1093/bioinformatics/btg412>.
- Pereira, L. H. G., R. Hanner, F. Foresti, & C. Oliveira, 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC Genetics* 14: 20, <http://bmccgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-14-20>.
- Platt, A., R. Woodhall, & A. George Jr, 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques* 43: 58–62.
- Rambaut, A., A. J. Drummond, D. Xie, G. Baele, & M. A. Suchard, 2018. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67: 901–904.
- Reid, N. M., & B. C. Carstens, 2012. Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC Evolutionary Biology* 12: 196.
- Reid, S., 1983. La biología de los bagres rayados *Pseudoplatystomas fasciatus* y *P. tigrinus*. En la Cuenca del río Apure, Venezuela. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología de Ciencia y Tecnología* 1: 13–41.
- Sambrook, J., & D. Russell, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. .
- Schindel, D. E., & S. E. Miller, 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* 435: 17–17.
- Sivasundar, A., E. Bermingham, & G. Orti, 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407–417.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- Tamura, K., & M. Nei, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution* 10: 512–526.
- Torrico, J. P., N. Hubert, E. Desmarais, F. Duponchelle, J. Nuñez Rodríguez, J. Montoya-Burgos, C. García Davila, F. M. Carvajal-Vallejos, A. A. Grajales, F. Bonhomme, & J.-F. Renno, 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Elsevier Inc. 51: 588–594.
- Will, K. W., B. D. Mishler, & Q. D. Wheeler, 2005. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Systematic Biology* 54: 844–851.

Yu, G., D. K. Smith, H. Zhu, Y. Guan, & T. T.-Y. Lam, 2017. ggtree : an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 28–36.

Tabelas

Tabela 1. Pontos do mapa e localidades de amostragem para as espécies de *Pseudoplatystoma* número total de amostras sequenciados para cada marcador.

Ponto Mapa	Localidade	Código	Bacia/Tributário	País	Espécie	n. COI	n. RC
1-*	Wonotobo falls	Wo	Rio Corantijn	Guiana	fas		1
2-*	Ireng	Iren	Branco	Guiana	pun		1
3-†	Castillos	Cas	Orinoco	Venezuela	met	2	
					ori	5	
4-†	Ciudad Guayana	CG	Orinoco	Venezuela	met	5	
					ori	7	
5-†	San Félix	SF	Orinoco	Venezuela	met	1	
					ori	7	
6-†	Caicara del Orinoco	CdO	Orinoco	Venezuela	met	6	
					ori	3	
7-†	Puerto Carreño	PC	Orinoco	Colômbia	met	36	10
					ori	19	3
8-†	Puerto Inírida	PIN	Orinoco	Colômbia	met	14	
					ori	10	
9-†	San José del Guaviare	SJG	Orinoco/Guaviare	Colômbia	met	14	
					ori	16	
10-†	Puerto López	PL	Orinoco/Meta	Colômbia	met	38	8
					ori	28	10
11-†*	Magdalena	mag	Magdalena	Colômbia	mag	9	12
12-†	La Pedrera	LP	Amazônica/Caquetá	Colômbia	pun	19	
					tig	1	
13-Δ	Iquitos	IQ/Clus	Amazônica/Amazonas	Peru	*Δpun		16
					*tig		13
14-*	Pucallpa	PU	Amazônica/Ucayali	Peru	*pun		9
					*tig		10
15-*	Puerto Maldonado	MD	Amazônica/Madre de Dios	Bolívia	*pun		9
					*tig		9
16-*	Manuripi	MAN	Amazônica/Madre de Dios	Bolívia	*pun		11
					*tig		4
17-*	Yata	Y	Amazônica/Mamoré	Bolívia	*pun		7
18-*	Securé	Se	Amazônica/Mamoré	Bolívia	*pun		10
					*tig		17
19-*	Ichilo	IC	Amazônica/Mamoré	Bolívia	*pun		7
					*tig		9
20-*	Puerto Salinas	BS	Amazônica/Beni	Bolívia	*pun		13
					*tig		7
21-*	San Martin	GSM	Amazônica/Iténez	Bolívia	*pun		14
					*tig		6
22-*	Paraguay Iténez	GPG	Amazônica/Iténez	Bolívia	*pun		19
					*tig		5
23-†	Rio Cautário	Ca	Amazônica/Cautário	Brasil	pun	9	8
					tig	1	
24-†	Guajará Mirim	GM	Amazônica/Mamoré	Brasil	pun	29	17
					tig	33	
25-†	Porto Velho	PV	Amazônica/Madeira	Brasil	pun	24	15
					tig	13	3
26-†	Humaitá	HM	Amazônica/Madeira	Brasil	pun	29	21
					tig	7	1
26-†	Lago Carapanatuba	C	Amazônica/Madeira	Brasil	pun	17	14
					tig	2	
28-†	Manicoré	Mc	Amazônica/Madeira	Brasil	pun	30	30
					tig	4	
29-†	Rio Branco	RB	Amazônica/Purus	Brasil	tig	9	2
30-†	Boca do Acre	Ba	Amazônica/Purus	Brasil	pun	19	16
					tig	2	
31-†	Lábrea	La	Amazônica/Purus	Brasil	pun	35	31
					tig	4	
32-†	Eirunepé	Ju	Amazônica/Juruá	Brasil	pun	15	14
					tig	2	
33-†	Tabatinga	Ta	Amazônica/Amazonas	Brasil	pun	22	20
					tig	14	1
34-†	Rio Ica	Ica	Amazônica/Iça	Brasil	tig	1	
35-†	Manaã	An	Amazônica/Japurá	Brasil	tig	22	
36-†	Tefé	Fe	Amazônica/Amazonas	Brasil	pun	27	22
					tig	21	1
37-†	Coari	Co	Amazônica/Amazonas	Brasil	pun	2	
					tig	2	

Tabela 1. Continuação.

38-†	Manaus	Mn	Amazônica/Amazonas	Brasil	pun	27	19
					tig	16	2
					ret		1
39-†	Boa Vista	BV	Amazônica/Branco	Brasil	pun	24	19
					tig	4	
40-†	Caracará	Car	Amazônica/Branco	Brasil	pun	9	7
41-†	São Gabriel da Cachoeira	RN	Amazônica/Negro	Brasil	pun	16	13
					tig	1	
					ret	20	4
42-†	Itacoatiara	Itc	Rio Amazonas	Brasil	pun	3	
					tig	19	
43-†	Nhamundá	Nh	Rio Amazonas	Brasil	pun	19	19
					tig	4	
44-†	Oriximiná	Ox	Rio Amazonas	Brasil	pun	22	22
45-†	Santarém	Sa	Rio Amazonas	Brasil	pun	26	23
					tig	11	
46-†	Itaituba	Ita	Amazônica/Tapajós	Brasil	pun	14	18
					tig	15	1
47-†	Jacareacanga	Ja	Amazônica/Tapajós	Brasil	pun	12	11
48-†	Altamira	Xi	Amazônica/Xingu	Brasil	pun	12	10
49-†	Rio Iriri	Ir	Amazônica/Iriri	Brasil	pun	18	12
50-†	Belém	Be	Rio Amazonas	Brasil	tig	1	
51-†	Itaipava	Ara	Amazônica/Araguaia	Brasil	pun	19	18
52-†	São Félix do Araguaia	Ara	Amazônica/Araguaia	Brasil	pun	3	
53-#	Rio Pandeiros	SF	São Francisco/Pandeiros	Brasil	*cor	3	
54-⌘	São Francisco	SF	São Francisco	Brasil	*cor	12	
55-†	Três Marias	RSF	São Francisco	Brasil	cor	3	3
56-†	Corumbá	Cb	Paraná/Corumbá	Brasil	cor	4	2
57-†	Ivilhema	RIv	Paraná/Ivilhema	Brasil	pun	1	
					cor	2	2
58-†	Salto Grande	Pan	Paraná/Paranapanema	Brasil	cor	2	
59-⌘	Rio Parana	PRB	Paraná	Brasil	*cor	18	
					*ret	9	
60-†	Rio Negro-Paraná	N	Paraná/Negro	Brasil	pun	1	
					cor	1	
61-†	Cuiabá	RC	Paraná/Cuiabá	Brasil	pun	3	3
					cor	2	
62-†	Cárceres	Cr	Rio Paraguai	Brasil	pun	3	3
63-*	Cárceres Laguna	Lag	Paraná	Brasil	cor		5
					ret		4
64-†	Miranda	RM	Paraná/Miranda	Brasil	pun	1	
65-†	Aquidauana	RA	Paraná/Aquidauana	Brasil	pun	3	2
Total						1018	679

O ponto referente a cada localidade é apresentado no mapa (Fig. 1). Espécies de acordo com Buitrago-Suárez & Burr (2007): pun= *P. punctifer*; fas= *P. fasciatum*; ret= *P. reticulatum*; tig= *P. tigrinum*; ori= *P. orinocoense*; met= *P. metaense*; cor= *P. corruscans* e mag = *P. magdaleniatum*. Informações sobre as origens das sequencias: †, presente estudo; *, Torrico et al. (2009); Δ, García-Dávila et al. (2013); #, Carvalho et al. 2011; ⌘ Carvalho et al 2012; © Pereira et al 2013

Tabela 2. Distância genética em porcentagem entre as espécies-linhagens delimitadas pelo mPTP, bGMYC e GMYC para *Pseudoplatystoma* com base no COI.

	1	2	3	4	5
1	0,14 %	0,007	0,008	0,011	0,014
2	3 %	0,07	0,006	0,011	0,014
3	3 %	2,2 %	0,02 %	0,012	0,014
4	5,8 %	6,5 %	6,8 %	0,54%	0,011
5	8,8 %	9 %	8,9 %	6,1 %	0,11 %

Na diagonal inferior são apresentados os valores de distância genética em porcentagem entre as espécies-linhagens delimitadas; na diagonal central os valores de distância genética intra espécie-linhagem e na diagonal superior os valores de desvio padrão. 1- *P. punctifer* (com listras e sem listras pretas), *P. reticulatum* da bacia do Paraná-Paraguai; 2- *P. tigrinum*, *P. metaense*; 3- *P. reticulatum* do rio Negro (bacia Amazônica), *P. orinocoense*; 4- *P. corruscans* e 5- *P. magdaleniatum*.

Tabela 3. Distância genética entre as espécies-linhagens delimitadas pelo bGMYC e GMYC para *Pseudoplatystoma* com base na RC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0,08 %	0,004	0,003	0,006	0,007	0,006	0,008	0,009	0,009
2	2,1 %	1 %	0,003	0,007	0,007	0,007	0,008	0,009	0,009
3	1,3 %	1,6 %	0,03 %	0,007	0,007	0,007	0,009	0,010	0,009
4	4 %	4,7 %	4,4 %	0,03 %	0,008	0,007	0,008	0,009	0,009
5	4,6 %	5,4 %	4,6 %	5,3 %	0,07 %	0,003	0,008	0,009	0,009
6	4,4 %	5,2 %	4,3 %	5,3 %	1,3 %	0,07 %	0,008	0,009	0,009
7	6,7 %	6,2 %	6,5 %	6,3 %	6,3 %	6,5 %	0,07 %	0,006	0,008
8	7,8 %	7,3 %	7,9 %	6,6 %	7,3 %	7,1 %	3,2 %	0,04 %	0,009
9	7,1 %	7,1 %	7,3 %	6,8 %	7,5 %	7,1 %	6,2 %	7,2 %	0,03 %

Na diagonal inferior são apresentados os valores de distância genética em porcentagem entre as espécies-linhagens delimitadas; na diagonal central os valores de distância genética intra espécie-linhagem e na diagonal superior os valores de desvio padrão. 1- *P. punctifer* (com listras pretas), *P. fasciatum*; 2- *P. punctifer* (sem listras pretas); 3- *P. reticulatum* da bacia do Paraná-Paraguai; 4- *P. reticulatum* do rio Negro (bacia Amazônica), *P. orinocoense*; 5- *P. tigrinum*; 6- *P. metaense*; 7- *P. corruscans* da bacia do São Francisco; 8- *P. corruscans* da bacia do Paraná-Paraguai e 9- *P. magdaleniatum*.

Legendas das Figuras

Figura 1. Pontos de coletas referente a 65 localidade de 35 rios para as 8 espécies do gênero *Pseudoplatystoma*.

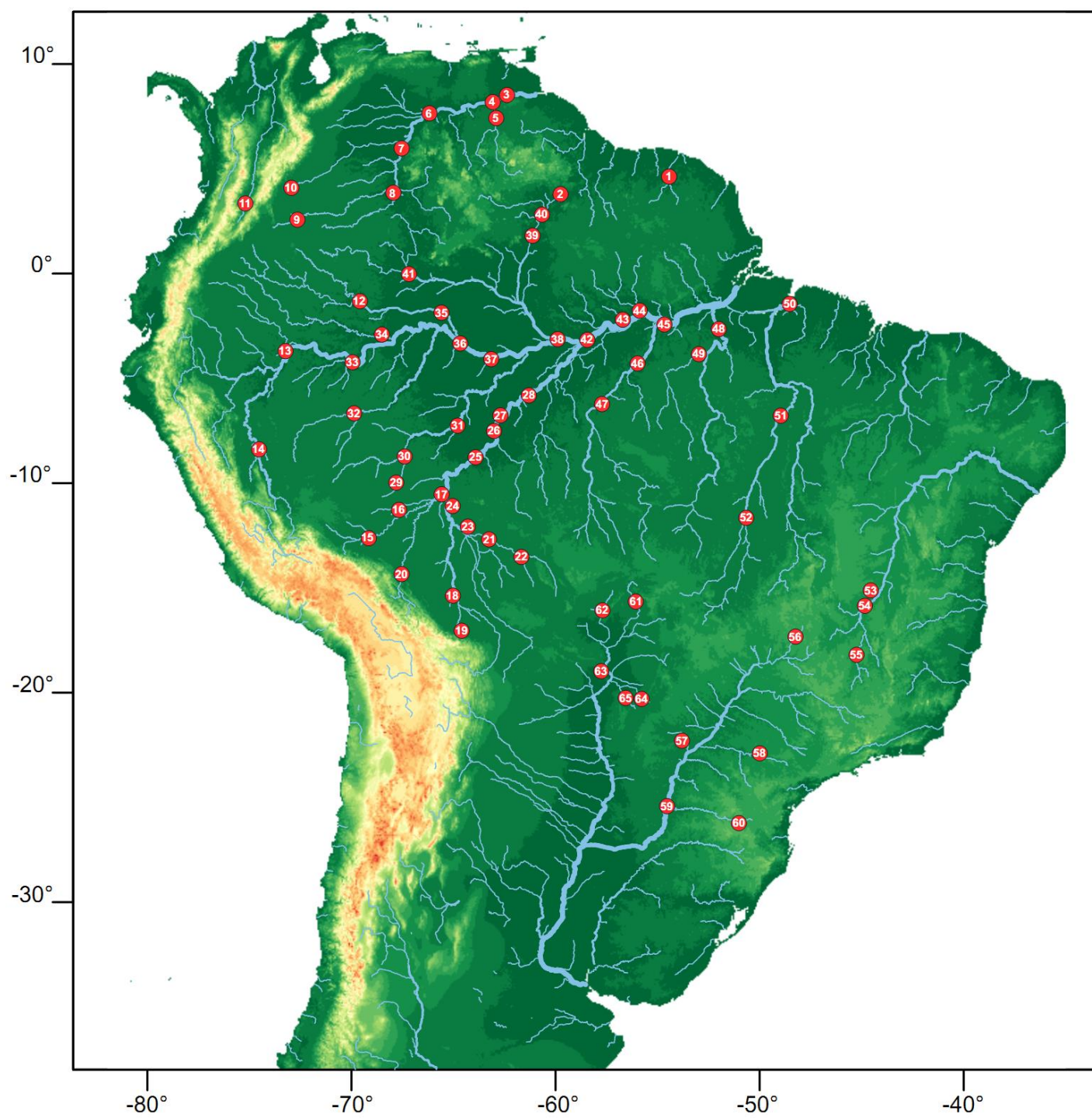
Figura 2. Árvore filogenética bayesiana (*Maximum clade credibility tree*) com base em 3.000 árvores posteriores geradas usando o BEAST. O conjunto de dados compreendeu 67 haplótipos, do total de 1.017 de sequências do gene COI de *Pseudoplatystoma* com 658 pares de bases. Probabilidades posteriores com suporte acima de 0.95 são mostradas com pontos vermelhos. As espécies-linhagens genéticas delimitadas pelo modelo mPTP, bGMYC e GMYC são demonstradas por caixas coloridas. A árvore foi apresentada usando o pacote ggtree 1.6.11.

Figura 3. Árvore filogenética bayesiana (*Maximum clade credibility tree*) com base em 3.000 árvores posteriores geradas usando o BEAST. O conjunto de dados compreendeu 339 haplótipos, do total de **679** de sequências da região controle (RC) de *Pseudoplatystoma* com 855 pares de bases alinhadas (incluindo 18 gaps). Probabilidades posteriores com suporte acima de 0.95 são mostradas com pontos vermelhos. As espécies-linhagens genéticas delimitadas pelo modelo mPTP, bGMYC e GMYC são demonstradas por caixas coloridas. A árvore foi apresentada usando o pacote ggtree 1.6.11.

Figura 4. Análises de Coordenadas Principais (PCA) para espécies do gênero *Pseudoplatystoma* com base em sequencias de DNA. A) Gene COI: 1017 sequencias com 658 pares de bases. B) RC: 679 sequências com 855 pares de bases (incluindo 18 gaps). A distância entre os aglomerados é aproximadamente proporcional às distâncias genéticas entre as espécies. As cores foram relacionadas com figura 2 para o COI e com a figura 3 para a RC.

Figuras

Figura 1.



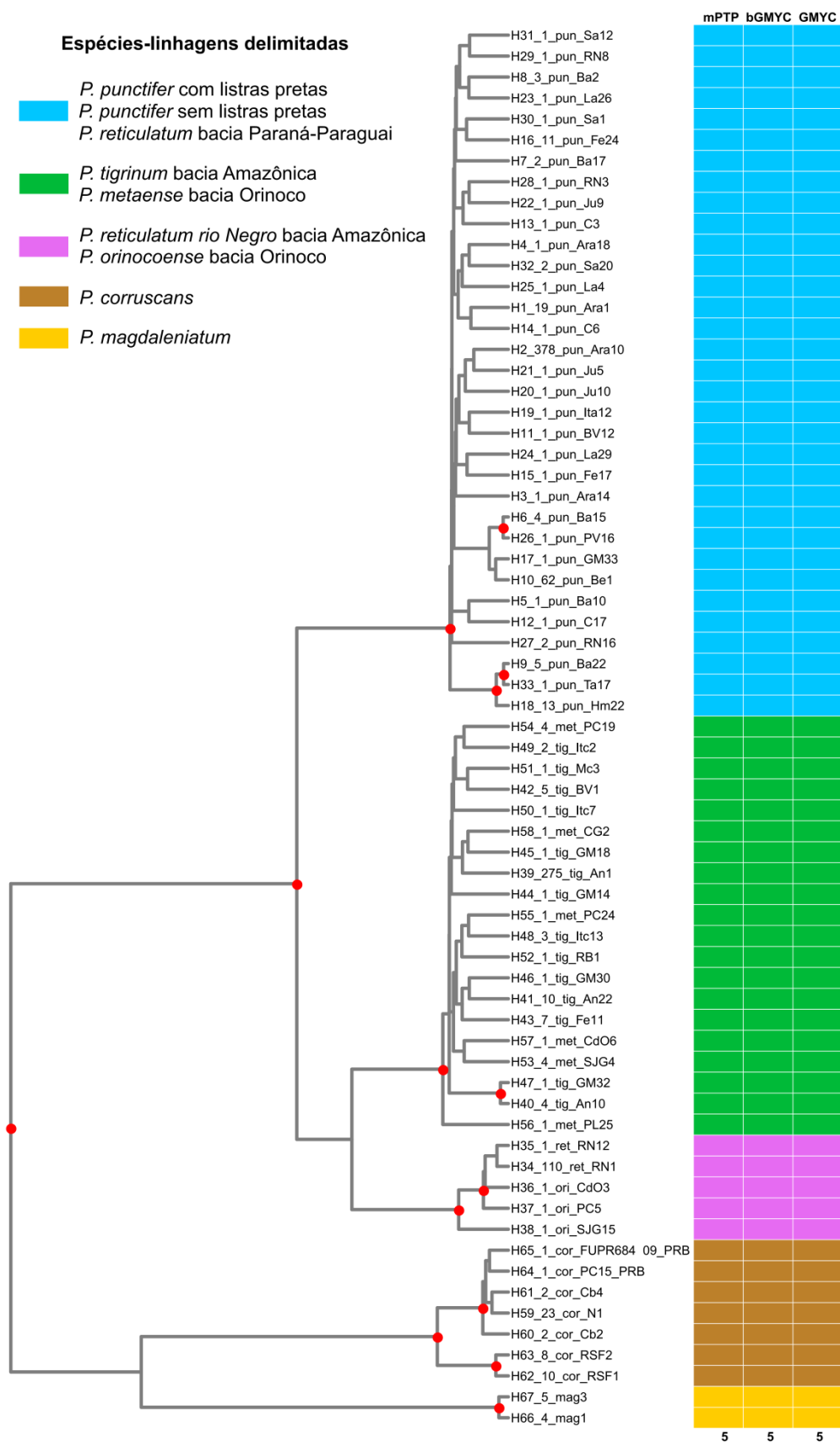


Figura 2.

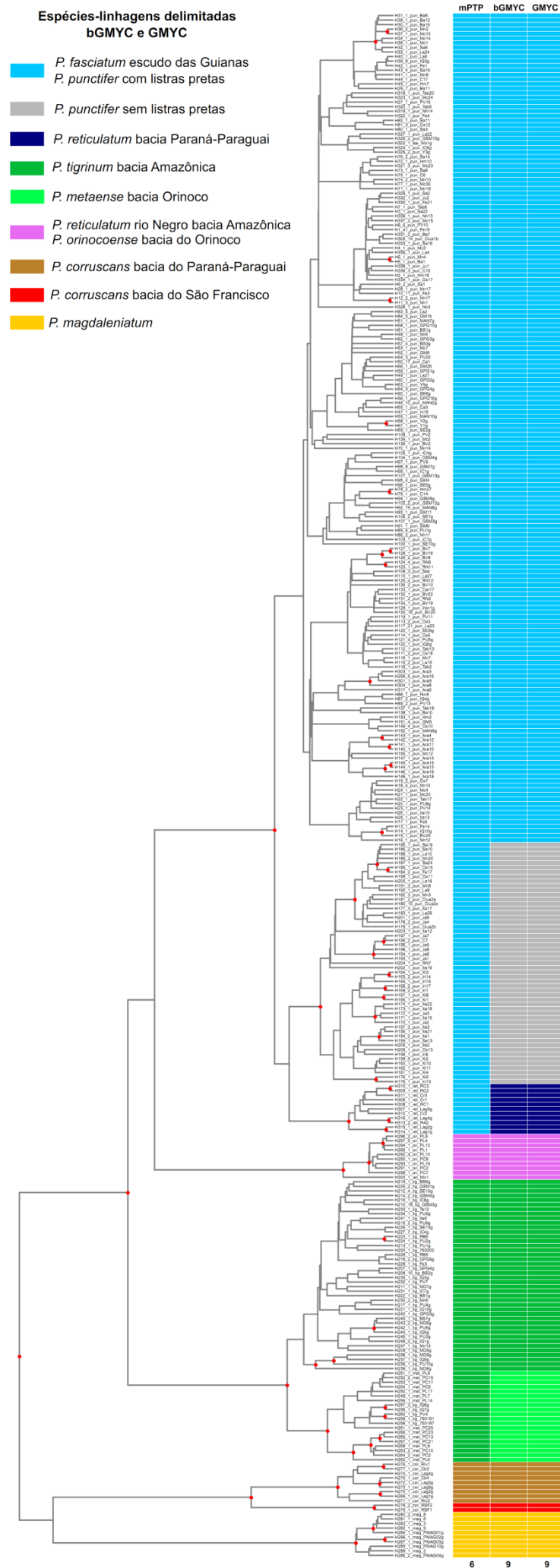


Figura 3.

Figura 4. A)

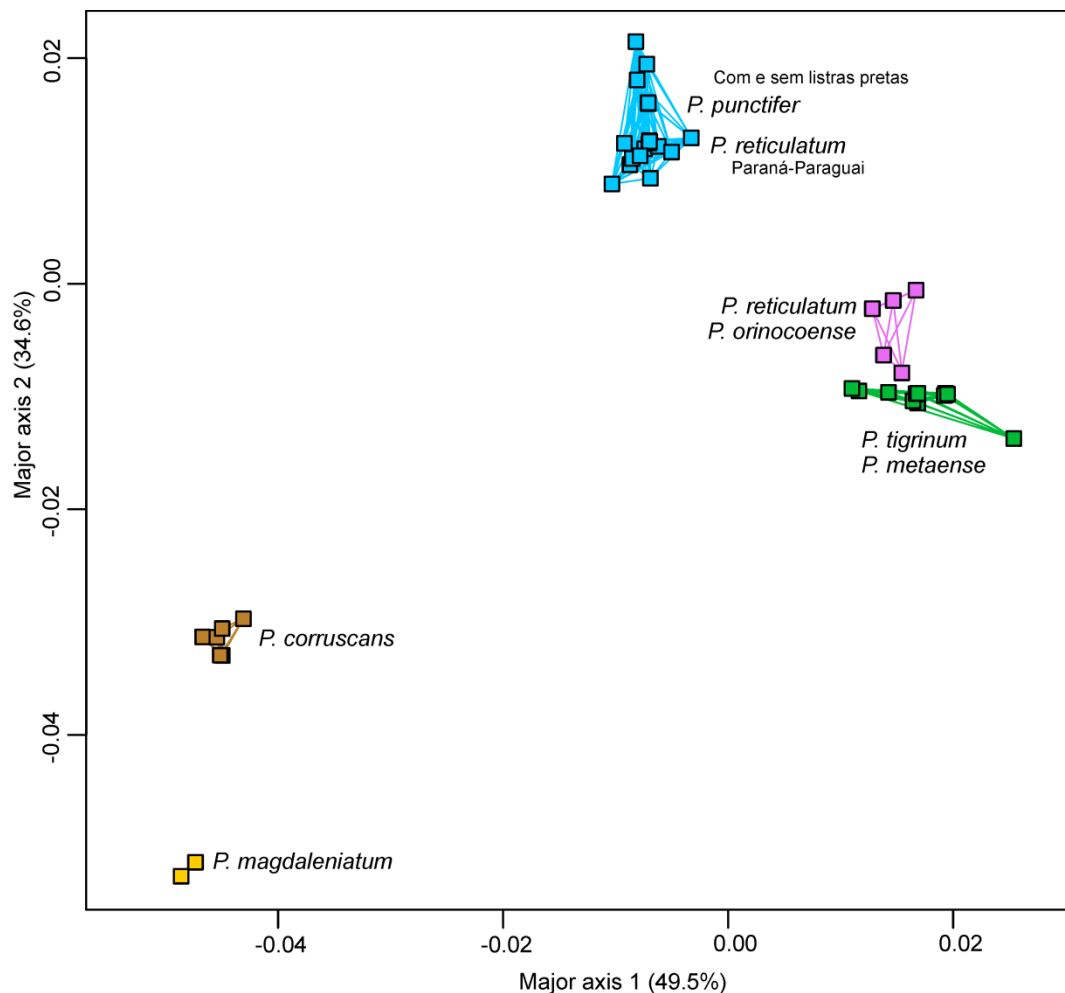
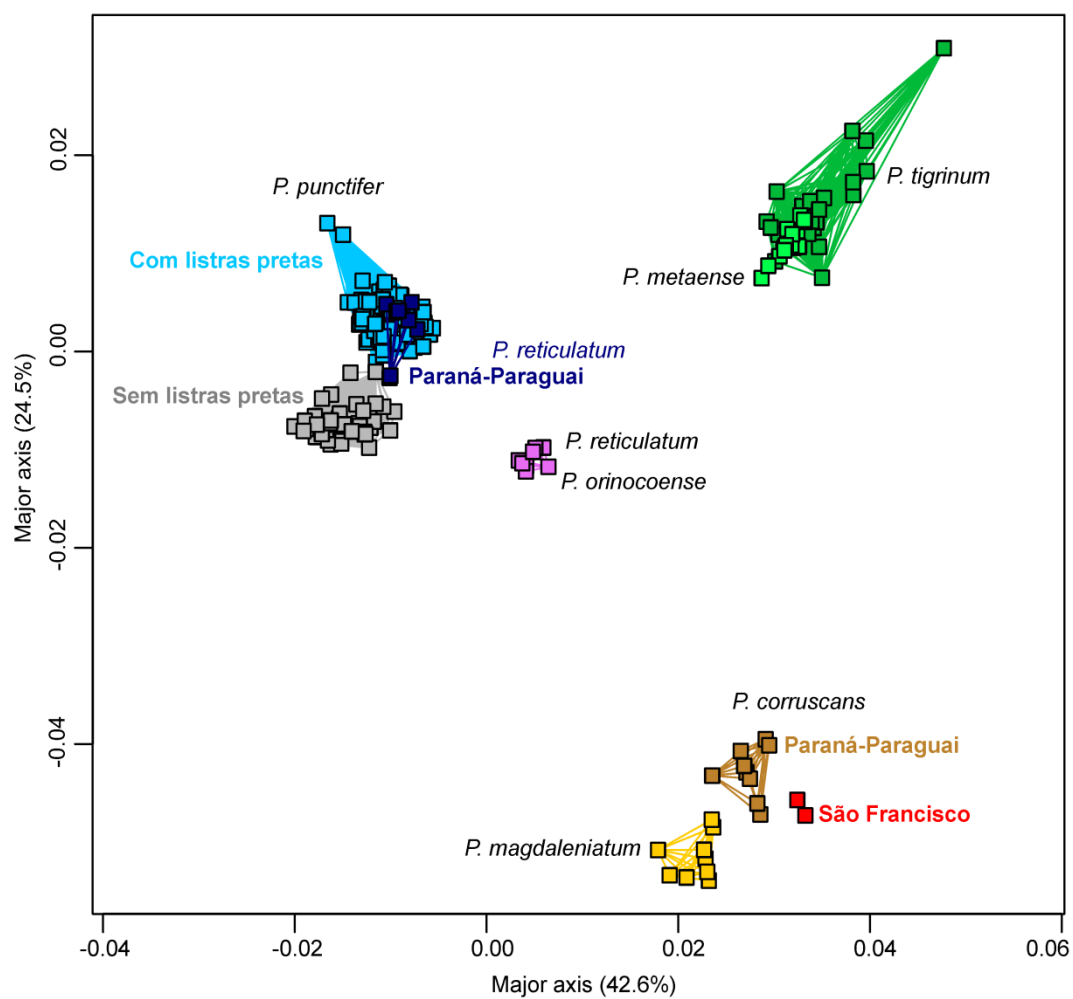


Figura 4. B)



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45

Antonio Saulo Cunha-Machado^{1,3}; Izeni Pires Farias^{2,3}; Tomas Hrbek^{2,3}; Maria Doris Escobar^{1,4}; José Antônio Alves-Gomes^{3,5}; Kyara Martins Formiga^{1,3} and Jacqueline da Silva Batista*^{1,3}

² Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Departamento de Genética, Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), Manaus, AM, Brazil.

⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil.

Manuscript under review: Hydrobiologia.

Abstract

Keywords: Mitochondrial DNA, microsatellite, Amazon Basin, restricted gene flow, conservation in the Amazon.

46 Introduction

47 The freshwater catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855)
48 (Siluriformes: Pimelodidae) plays an important role as a top predator with both
49 generalistic and opportunistic behavior in the Amazonian Basin ecosystem, where it is
50 widely distributed (Buitrago-Suárez & Burr, 2007). This species is one of the most
51 exploited catfishes of the Amazon and is also exported to other Brazilian states and
52 countries due to its wide market acceptance and consequently high economic value
53 (Barthem & Goulding, 1997). Ecological and population genetic studies conducted to
54 date have shown that migration of species of *Pseudoplatystoma* occurs at a regional
55 scale (middle-distance migration 100 – 1500 kilometers km) (Godinho et al., 2007;
56 Pereira et al., 2009; Telles et al., 2014; Doria et al., 2018). Based on a biotelemetry
57 study it was also observed that *P. punctifer* presents partial migration (Hahn et al.,
58 2019), a situation where populations are composed of both migratory and resident
59 individuals (Jonsson & Jonsson, 1993).

60 In general, a distribution of a species is associated with habitat connectivity,
61 which, to some degree, allows dispersal of organisms between areas (MacArthur et al.,
62 1967). The movement of aquatic species within drainage basins can be disrupted by
63 many types of natural barriers including rapids and waterfalls, hydrochemical
64 parameters of water, and other characteristics that could promote dissimilarities between
65 different populations. These barriers would explain the genetic structuring of aquatic
66 species in the same watershed. Thus, detecting fish stocks and determining the pattern
67 of migration between them may help to conservation policies for freshwater fish species
68 (Rahel, 2007; Farias et al., 2010; Terencio et al., 2012).

69 The journey of migratory species is often interrupted by anthropogenic barriers,
70 especially by the damming of large rivers. About two-thirds of the major world rivers
71 are fragmented by hydroelectric dams (Winemiller et al., 2016), which has resulted in
72 unprecedented ecological and social impacts despite their unquestionable benefits for
73 humans (Fearnside, 2016). In the Madeira River (the largest tributary of the Amazonas
74 River) existed a series of 18 rapids and waterfalls, extending over a distance of 290 km,
75 between the city of Guajará-Mirim (situated on the right bank of the Mamoré River) and
76 Porto Velho (situated in the right bank of the Madeira River) (Fig. 1) (Cella-Ribeiro et
77 al., 2013). However, only the rapids of Jirau and Teotônio (the two largest) were
78 formally designated as waterfalls due to the accentuated declivity above and below the
79 rapids (Cella-Ribeiro et al., 2013). The 290 km of rapids and waterfalls between

80 Guajará-Mirim and Porto Velho delimit two distinct regions. The area upstream of the
81 rapids (termed as Mamoré/Guaporé sub-basin in this article) is composed of four major
82 rivers (Guaporé, Mamoré, Beni, and Madre de Dios), which meet to form the Madeira
83 River. The lower Madeira sub-basin starts immediately downstream from the rapids,
84 close to Porto Velho and extends to the confluence with the Amazonas River (Doria et
85 al., 2018). The Jirau and Teotônio waterfalls, as well as eight other rapids of the
86 Madeira River, were submerged between the years of 2011 and 2012 by the reservoirs
87 of Jirau and Santo Antônio hydroelectric dams (Doria & Lima, 2015). Studies done
88 before the construction demonstrated a clear difference in the fish assemblage between
89 Mamoré/Guaporé and lower Madeira sub-basins, which indicates that waterfalls from
90 Madeira River acted as geographic barriers delimiting fish distributions and limiting
91 migration between the sections (Torrente-Vilara et al., 2011).

92 Telles et al. (2014) studied the geographic structuring of genetic variation of *P.*
93 *punctifer* in a portion of the Amazon basin (Purus and Solimões rivers, and the
94 Mamoré/Guaporé sub-basins) using seven heterologous microsatellites markers. The
95 authors found a high genetic diversity associated with a low genetic structure. Although
96 genetic distances showed a relatively low correlation with geographic distances, the
97 authors suggested that they were compatible with isolation by distance and analogous
98 processes related to local dispersal constraints and spatially structured levels of gene
99 flow. Although this publication was a starting point for the study of genetic
100 differentiation in the species, the distribution of the genetic groups and role of Madeira
101 rapids as a geographical barrier to dispersal and gene flow of *P. punctifer* was not
102 examined.

103 Knowing the distribution of genetic groups and the pattern of gene flow between
104 the Mamoré/Guaporé and lower Madeira sub-basins before the constructions of dams
105 could shed important light on our understanding of migratory habits and life history of
106 *P. punctifer* of these sub-basins. It may also help us understand how hydroelectric dams
107 affect aquatic species migration and improve our ability to suggest local conservation
108 measures for *P. punctifer* and other ecologically similar species.

109 Therefore, we used mitochondrial DNA and microsatellites molecular markers
110 to estimate the genetic diversity, genetic differentiation, and gene flow of *P. punctifer*
111 between the Mamoré/Guaporé sub-basin and the lower sub-basin of Madeira River
112 using samples obtained before the construction of the two hydroelectric dams. Using
113 this design, we wanted to test if the rapids of the upper Madeira River functioned as

114 barriers limiting the gene flow of this species. Obtaining this information is crucial for
115 our understanding of the impact of the hydroelectric dams on connectivity within the
116 Madeira River basin, and consequently our ability to mitigate this impact.

117

118 **Material and methods**

119 *Study area*

120 The Mamoré/Guaporé sub-basin and the lower Madeira area highly
121 heterogeneous, characterized by sharp vegetational transitions and water types
122 (Torrente-Vilara et al., 2011; Doria & Lima, 2015). The Guaporé River is a clearwater
123 river flowing from the Brazilian Shield. The Cautário River (CR) also is a clear water
124 system, and one of the principal tributaries of the Guaporé River (Doria & Lima, 2015).
125 The Guaporé River flows into the Mamoré River shortly upstream of Guajará-Mirim
126 (GM) where also begins the region of rapids (Fig. 1). The Madeira River exists only
127 within Brazilian territory and is formed by the confluence of the Mamoré/Guaporé and
128 the Beni/Madre de Dios rivers at the transition zone of the Cerrado, Bolivian Llanos,
129 and the Amazon rainforest. Both the Beni and the Madre de Dios originate in the
130 Andean Altiplano while the Mamoré originates in the planes of the Bolivian basin, and
131 thus all three rivers are white water rivers rich in suspended sediment (Doria & Lima,
132 2015).

133 Downstream of the last rapid, currently submerged by the Santo Antônio
134 hydroelectric dam (Fig. 1), the Madeira River enters a floodplain (várzeas). In this
135 section water velocity decreases, resulting in the sedimentation of suspended material
136 and entry of light into the water column. The principal tributaries of the Madeira are
137 found in this section, as well as numerous floodplain lakes generally formed by the
138 damming of the mouths of tributaries or elbow lakes which are abandoned and river
139 meanders (Doria & Lima, 2015). Among these lakes is also the Carapanatuba Lake
140 (CL) which is located 362 km downstream of Porto Velho (PV) and 271 km upstream
141 of Manicoré (MC).

142

143 *Sample collection and DNA extraction*

144 We used ninety-nine muscle tissue samples of *Pseudoplatystoma punctifer*,
145 which were collected at five different sites of the Madeira basin (Fig. 1) between 2005
146 and 2009, before the Santo Antonio and Jirau dams were built. The samples were

147 obtained at fish landing sites (information of samples collected in Table S1). Two of the
148 sampling sites were located in the Mamoré/Guaporé sub-basin (upstream of the rapids)
149 and the remaining three were located in the Madeira sub-basin (downstream of the
150 rapids) (Fig. 1). We fixed the samples in 95% ethanol and stored them in the Collection
151 of Genetic Resources of the National Institute of Amazonian Research (INPA) and in
152 the Collection of Animal Genetics Tissue of the Federal University of Amazonas
153 (CTGA/UFAM) Manaus, Brazil, for posterior DNA analyses. We extracted the genomic
154 DNA using the phenol-chloroform protocol/proteinase K protocol (Sambrook &
155 Russell, 2001).

156

157 *Amplification: Microsatellite loci and mitochondrial DNA*

158 We amplified ten nuclear microsatellites (nuDNA) loci developed for *P.*
159 *punctifer* by Saulo-Machado et al. (2011) by polymerase chain reaction (PCR) and
160 followed the thermocycling conditions of Batista et al. (2010) to perform the PCRs in a
161 total volume of 10µL. We stained the PCR products with GelRed (Biotium) and verified
162 their size and quality in 1.5% agarose gels. The genotyping was carried out in a
163 multiplex PCR with the following fluorescent primer types and length of the locus:
164 multiplex 1 contained Ppu1 FAM (192-240bp), Ppu8 FAM (298-300bp), Ppu7 NED
165 (218-226bp), Ppu14 NED (302-372bp), and Ppu2 HEX (258-286bp); multiplex 2
166 contained Ppu5 FAM (228-260), Ppu11 FAM (330-340) Ppu13 NED (233-247), Ppu4
167 NED (272-320) and Ppu12 HEX (257-277). We used an ABI 3130xl Genetic Analyzer
168 for genotyping and the program GENEMAPPER v 4.0 to perform the fragment
169 analyses. In total we genotyped 99 individuals for the 10 loci.

170 The mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene (mtDNA) was
171 amplified via PCR using the primers BOLCOIF3:
172 5'TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCCA3' and BOLCOIR3:
173 5'CTTCYGGGTGRCCRAARAATCA3' (Ward et al., 2005), modified from Ortiz,
174 (2010). The total volume of each PCR was 25µL, containing 2mM MgCl₂; 0.2 mM
175 dNTPs; 1x buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl); 0.32 µmol of the forward and
176 reverse primer; 1 U of Taq DNA (Invitrogen) and 10 ng of DNA; thermocycling
177 conditions were: 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 40 s
178 and extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 10 min. We
179 purified the PCR products by polyethylene glycol/ethanol precipitation (Paithankar &

180 Prasad, 1991) and carried out sequencing reactions following Platt et al., (2007)
181 utilizing BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit. We performed two
182 sequencing reactions one with the BOLCOIF3 primer and the other with BOLCOIR3
183 primer, both using an ABI 3130xl Genetic Analyzer. In addition to these sequences, we
184 also included COI sequences of an additional 96 individuals deposited in Genbank
185 (GenBank numbers Supplementary Table S1).

186

187 *Data Analysis*

188 *Genetic diversity and differentiation*

189 We tested the microsatellite loci for the presence of null alleles in MICRO-
190 CHECKER 2.2.1 (Van Oosterhout et al., 2004). We estimated the genetic variability of
191 *P. punctifer* across the ten nuDNA microsatellite loci using the following parameters:
192 number of alleles (A), allelic richness (Ar), total expected and observed heterozygosity
193 (H_E , H_O), and number of private alleles. We estimated deviation of Hardy–Weinberg
194 equilibrium (HWE), inbreeding coefficient (F_{IS}), and linkage disequilibrium in
195 GENALEX 6.41 (Peakall & Smouse, 2006) and FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995).

196 The consensus sequences of the partial COI gene were generated by edition and
197 alignment in the program SEQSCAPE 2.7 (Applied Biosystems). We utilized the
198 program DNASP 6.0 to compute the COI genetic diversity estimates (Rozas et al.,
199 2017). The haplotype network to visualize the haplotype relationships was inferred by
200 the program HAPLOVIEWER (Salzburger et al., 2011).

201 Differentiation among sub-basins using microsatellite and mtDNA was
202 estimated using analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier et al. 1992),
203 which quantifies differentiation among groups of samples defined a priori. Pairwise
204 genetic differentiation among the five localities was estimated using fixation indexes
205 (F_{ST} and Φ_{ST}). We used the Benjamini-Hochberg procedure (BH) (Benjamini &
206 Hochberg, 1995) for correcting P values and the False Discovery Rate (FDR) ($P <$
207 0.05), to test the significance levels of fixation indexes (F_{ST} and Φ_{ST}). For BH and FDR
208 estimates we used the sgof v.2.3 package (Castro-Conde & Uña-Álvarez, 2014) in the
209 statistical language R v.3.6.0 (R Core Team, 2019).

210 We tested the presence of isolation-by-distance (IBD) for five sampling
211 localities using Mantel tests between a matrix of genetic distances [linearized
212 uncorrected pairwise F_{ST} values, $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ for nuDNA and Φ_{ST} for mtDNA] and a
213 matrix of geographic distances in kilometers (km). Geographical distances in kilometers

214 (km) (following the course of rivers) among the sampling localities were retrieved from
215 GoogleEarth, version 7.2 (Google Inc). The Mantel test was performed with the
216 ADEGENET package (Jombart, 2008) in R with the *mantel.randtest* function (999
217 permutations). Correlations between genetic and geographic distances can be due to
218 IBD, which results from either continuous clines of genetic differentiation or the
219 existence of distant and differentiated populations (distant patches). We plotted local
220 densities of distances to disentangle the two patterns. These were measured using a 2-
221 dimensional kernel density estimation (function *kde2d*), and the results were displayed
222 by a customized color palette using *image* in the MASS package (Venables & Ripley,
223 2002) in R.

224 For microsatellites, we assessed the genetic differentiation of *P. punctifer* from
225 lower Madeira and Mamoré/Guaporé sub-basins localities using the program
226 STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). We tested the number of clusters (K)
227 ranging from 1-10, with 20 independent runs for each value of K. Each cluster was
228 estimated with 100,000 “burn-in” and 1,000,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC)
229 using the admixture and the correlated allelic frequency model with a prior location.
230 These results were processed using the STRUCTURE HARVESTER script (Earl &
231 vonHoldt, 2012) and the most likely number of genetic clusters (K) was determined
232 using the model log-likelihood ($\log(P(X|K))$) (Falush et al., 2003) and Delta K methods
233 (Evanno et al., 2005). The program CLUMPP v1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007)
234 was used to summarize the results from 20 independent STRUCTURE runs, and bar
235 plot results were generated using DISTRUCT v.1.1 (Rosenberg, 2003). To further
236 explore the genetic differentiation, we also conducted Discriminant Analysis of
237 Principal Components (DAPC) that submits genetic data to a principal component
238 analysis (PCA) and thus conducting discriminant analysis (DA) on those principal
239 components (Jombart et al., 2010). The discriminants functions are based on linear
240 combinations of alleles harboring the greatest between-group variation and the smallest
241 within-group variation (Jombart et al., 2010). DAPC is implemented in the
242 ADEGENET package (Jombart, 2008; Jombart et al., 2010) in R (R Core Team, 2019).
243 The optimal number of Principal Components (PCs) retained and used in analyses was
244 optimized using a cross-validation method with the function *xvalDapc*, using varying
245 numbers of PCs. To explore how the genetic variation was partitioned among sampling
246 localities, we ran the function *dapc* using the sampling localities as a prior. The number
247 of Principal Components (PCs) retained for DAPC analyses was calculated using a

248 cross-validation method implemented in *xvalDapc* function of the ADEGENET
249 package.

250

251 Gene flow

252 The gene flow (migration rates) was indirectly estimated from the F_{ST} and Φ_{ST}
253 values among localities and is represented by the actual number of migrants per
254 generation (Nm) where F_{ST} and Φ_{ST} are converted into Nm using the formula
255 $(1+4Nm)^{-1}$ (Slatkin, 1985). We performed analyses for microsatellite and mtDNA
256 (AMOVA, F_{ST} , Φ_{ST} , and Nm) in the program ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer,
257 2010) with 10,000 permutations. Additionally, Population Migration ($2NM$) for
258 microsatellite and mtDNA were also measured by using the isolation-with-migration
259 framework implemented in the program IMA2 (coalescent estimates) (Hey, 2010). We
260 determined the direction of migration rates between two sub-basin samples. We ran 50
261 chains with dynamic heating and collected 100.000 chains from 10.000,000 generated
262 topologies. Topologies were collected after an initial burn-in period of 2.000,000
263 topologies when the parameter estimates stabilized.

264

265 Results

266 Genetic diversity microsatellites and COI

267

268 The MICRO-CHECKER analyses indicated the occurrence of null alleles in
269 locus Ppu5 of animals from the Guajará-Mirim locality. The multi-locus analysis
270 including 99 individuals (10 loci) from the five sampling localities revealed 104 alleles.
271 The matrix of genotypes is available at Supplementary Table S2 and
272 <https://github.com/legalLab/publications>. The average observed number of alleles
273 observed heterozygosities (H_O), and expected heterozygosities (H_E) per locality ranged
274 from 4.9 to 7.3, from 0.517 to 0.532, and from 0.548 to 0.596, respectively (Table 1).
275 All sampling localities yielded low inbreeding coefficients (F_{IS}) that ranged from 0.064
276 to 0.124 (Table 1). Genetic diversity indices for all loci and locations are presented in
277 Supplementary Table S3. Deviations from HWE were observed after Benjamini-
278 Hochberg correction and FDR ($P < 0.05$), for *P. punctifer* from Carapanatuba Lake
279 (Ppu12) and Guajará-Mirim (Ppu2, Ppu5) (Table S3). Only the locus Ppu5 presented
280 the probable presence of null alleles for Guajará-Mirim samples. The frequencies of the
281 alleles 206-218 (Ppu1), 267-273 (Ppu12), and 237 (Ppu13) were up to 63% higher in

282 individuals from Carapanatuba Lake, compared to individuals from other locations
 283 (Table S4). Twenty-seven alleles were private and distributed throughout all the five
 284 sampled localities (Supplementary Table S5). The individuals from Carapanatuba Lake
 285 (lower Madeira sub-basin) showed the lowest number of private alleles (2). The
 286 individuals Mamoré/Guaporé sub-basin (upstream of rapids) showed the highest
 287 number of private alleles (15 alleles) (Supplementary Table S5). No linkage
 288 disequilibrium was observed among the 225 pairwise comparisons of the 10 loci, after
 289 Benjamini-Hochberg correction (adjusted $P = 0.00111$) (FDR $P < 0.05$).

290 We obtained partial COI sequences of 536 bp for 82 individuals (GenBank
 291 numbers Supplementary Table S1). Besides, 14 sequences were recovered from
 292 GenBank (Ortiz, 2010) (Table S1). The COI sequences were analyzed from 96
 293 individuals sampled at five localities encompassing both lower Madeira and
 294 Mamoré/Guaporé sub-basins. There were no unexpected stop codons, insertions, or
 295 deletions in the sequences. The highest diversity was found within the lower Madeira
 296 sub-basin (downstream of rapids), with the largest nucleotide ($\pi = 0.00188 \pm 0.00051$)
 297 and haplotype ($hd = 0.620 \pm 0.099$) diversity in the samples from Porto Velho (Table 1).
 298 We observed 11 haplotypes with 11 variables and 5 parsimony informative sites. The
 299 haplotype network topology is shown in Fig. 2. The most frequent haplotype (H1) was
 300 shared by 46 individuals from the lower Madeira sub-basin and four individuals from
 301 the Mamoré/Guaporé sub-basin at Guajará-Mirim. The second most frequent haplotype
 302 (H3) was shared by 35 individuals from all sampling localities with higher frequencies
 303 in individuals from the Mamoré/Guaporé sub-basin. Singleton haplotypes were
 304 recorded for seven individuals from four sampling localities (H5, H6, and H7
 305 Carapanatuba Lake; H8 and H9 Porto Velho; and H10 and H11 Cautário River).

306

307 **Genetic differentiation**

308 The AMOVA from microsatellites data, revealed no significant genetic
 309 differentiation ($F_{ST} = 0.003$ $P = 0.586$) between sub-basins (Supplementary Table S6).
 310 However, the AMOVA of COI revealed significant genetic differentiation ($\Phi_{ST} = 0.391$;
 311 $P < 0.001$) between the lower Madeira and Mamoré/Guaporé sub-basins
 312 (Supplementary Table S7). The F_{ST} estimated between pairs of sampled localities
 313 ranged from -0.002 to 0.070 (Table 2) and the values were not significant ($P < 0.05$,
 314 after BH correction and FDR). Pairwise comparisons of all Φ_{ST} values showed

315 significant genetic differentiation ($P < 0.05$) when they involved comparisons between
316 localities of the lower Madeira sub-basin and the Mamoré/Guaporé sub-basin (Table 3).

317 The Mantel test for microsatellite data, did not support the isolation by distance
318 model (IBD) ($r = 0.399$, $P = 0.159$). However, the two-dimensional kernel density
319 estimation indicated a continuous cline of genetic differentiation among sampling
320 localities, with a high-intensity cloud (between 0 - 700 km) transitioning to a medium
321 intensity cloud (between 700 - 1100 km) (Fig. 3a). Mantel test for mtDNA, showed
322 significant association between genetic and geographic distance (km) with $r = 0.905$, P
323 $= 0.008$. The two-dimensional kernel density estimation indicated a continuous cline of
324 genetic differentiation among sampling localities with a high-intensity cloud (between 0
325 - 600 km) transitioning to a medium intensity cloud (between 600 - 1331 km) (Fig. 3b).

326 STRUCTURE analyses identified three genetic clusters for *P. punctifer*, that
327 were supported by the highest log-likelihood ($K = 3$; mean $\text{LnProb} = -2766.165000$)
328 and delta K (8.714076) (Fig. 4). The STRUCTURE results suggest that the samples
329 from two localities of the Mamoré/Guaporé sub-basin (Guajará-Mirim and Cautário
330 River) belong to one genetic cluster (cluster 1), the membership proportion (Q) being
331 greater than 0.900 (Fig. 4a). The other genetic clusters detected (clusters 2 and 3)
332 belong to the lower Madeira sub-basin and revealed variable degrees of admixture.
333 Cluster 2 was best represented ($Q = 0.693$) by the samples of Carapanatuba Lake. The
334 membership proportion for Cluster 3 was higher in the samples from Manicoré ($Q =$
335 0.791) than the samples from Porto Velho ($Q = 0.668$). Also, some individuals from
336 Manicoré presented $Q > 0.900$ for cluster 3 (Fig. 4a).

337 The DAPC for localities presented the samples of Guajará-Mirim and Cautário
338 River (Mamoré/Guaporé sub-basin) with overlapping ellipses and separated from other
339 localities indicating genetic differentiation from the localities of lower Madeira sub-
340 basin (downstream the rapids) (Fig. 5). In this study, 20 PCs were retained with median
341 and confidence intervals for a random chance of 97.5 % (0.2801). The discriminant
342 analysis used 20 PCs and 4 discriminant functions to visualize the genetic variance
343 among the sampling localities (Fig. 5). The ellipse of Porto Velho showed the greatest
344 proximity to Guajará-Mirim and Cautário River. The ellipse of Manicoré overlapped
345 with Porto Velho. Only one cluster in the main channel of the Madeira River
346 (downstream of the rapids) was observed. The ellipse of Carapanatuba Lake overlapped
347 only partially with the Manicoré ellipse (Fig. 5).

348

349 Connectivity

350 The number of migrants per generation (Nm) between pairs of localities based
351 on Slatkin (1985), ranged from infinite to 83.07 (values above in Table 2) based on
352 microsatellite data. The Population Migration (2NM) from upstream to downstream
353 rapids ($2N0M0 > 1 = 4.032$; $P = 0.119$) is higher when compared with downstream to
354 upstream rapids ($2N1M1 > 0 = 1.969$; $P = 0.336$), according to the effective number of
355 migrants estimated with IMA2 for microsatellites data (Fig. 6).

356 A low number of migrants (Nm) was observed when samples from upstream and
357 downstream of rapids were compared considering mtDNA data (values above in Table
358 3). Furthermore, a high rate of Population Migration (2NM) ($2N0M0 > 1 = 33.054$; $P =$
359 0.005) from Mamoré/Guaporé sub-basin to the lower Madeira sub-basin was observed,
360 while gene flow from downstream to upstream was not observed ($2N1M1 > 0 = 0.000$; P
361 $= 0.237$) (Fig. 6).

362

363 DISCUSSION

364 Genetic diversity of *Pseudoplatystoma punctifer*

365 It is well known that H_O suffers from sampling effects, therefore we used H_E as
366 an estimate of genetic diversity (Frankham et al., 2010). The average H_E values for *P.*
367 *punctifer* for the microsatellite data were homogeneous across the sampling localities,
368 ranging from 0.548 to 0.596 (Table 1). Although these values are in agreement with
369 microsatellite data from DeWoody & Avise, (2000), who reported an average $H_E = 0.54$
370 for freshwater fish, Santos et al. (2018) showed that H_E reported for most Amazonian
371 fishes are more similar to those for marine fishes ($H_E = 0.77$). In our analysis, we
372 included the loci Ppu8 (with only 2 alleles for all the populations, and monomorphic for
373 the Cautário River) and Ppu11 (2 alleles). When these loci are excluded from the
374 analyses, the mean H_E for *P. punctifer* is 0.700. This H_E is then similar to H_E of
375 Amazonian taxa reported by Santos et al. (2018) as well as Telles et al. (2014) (H_E
376 $= 0.708$) for *P. punctifer*. The mean inbreeding coefficient ($F_{IS} = 0.091$) for *P. punctifer*
377 indicated random mating within the localities (range 0.064 from 0.124, Table 1).
378 However, Telles et al., (2014) noted a high global value of F_{IS} (0.254), with values
379 within local populations ranging from 0 to 0.600, indicating non-random mating. The
380 difference between our results of F_{IS} concerning the results obtained by Telles et al.
381 (2014) may be due to the heterologous microsatellites used by them.

382 Considering the mtDNA (COI) data, haplotype (Hd) and nucleotide (π) diversity
383 indices obtained for *P. punctifer* were highly heterogeneous among the sampled
384 localities. The average calculated from values in Table 1 were higher ($Hd = 0.650$, $\pi =$
385 0.0018) than those reported by García-Dávila et al. (2013) (Cluster-1 $Hd = 0.182$, $\pi =$
386 0.00030 ; Cluster-2 $Hd = 0.432$, $\pi = 0.00080$) in populations of *P. punctifer* sampled at
387 the Loreto region (Peru) of the Amazon basin. However, haplotype diversity (Hd)
388 estimated from COI gene in other species of *Pseudoplatystoma* are also low to
389 moderate; $Hd = 0.371$ in *P. tigrinum* (Valenciennes, 1840) and $Hd = 0.511$ in *P.*
390 *reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) and $Hd = 0.555$ in *P. magdaleniatum*
391 (Buitrago-Suárez & Burr, 2007) (Ortiz, 2010).

392

393 Genetic Differentiation and Gene Flow

394 How many genetic groups of *P. punctifer* are there? Based on the analysis of
395 microsatellites using STRUCTURE, and DAPC, we identified three genetic clusters.
396 Cluster 1 comprising Guajará-Mirim and Cautário (Mamoré/Guaporé sub-basin), cluster
397 2 comprising Carapanatuba Lake, and cluster 3 comprising Manicoré and Porto Velho
398 (both from lower Madeira sub-basin) (Figs. 4 and 5). Most of the significant differences
399 were observed between sub-basins (Figs. 4 and 5), which was also evidenced by Φ_{ST} ,
400 AMOVA for COI (Table 3, Table S7), and in the haplotypes network (Fig. 2). However,
401 in the lower Madeira, the Manicoré, Porto Velho, and Carapanatuba Lake localities
402 show admixture, with Porto Velho showing admixture with upstream localities (Fig.4).
403 The lower genetic differentiation observed between Manicoré and Porto Velho ($F_{ST} = -$
404 0.003) (Table 2) is also evidenced by the sharing of migrants, observed in the results of
405 DAPC (Fig. 5) and STRUCTURE (Fig. 4). The membership proportion for cluster 3
406 was higher in the samples of Manicoré ($Q = 0.791$) and Porto Velho ($Q = 0.688$), which
407 was also observed in Carapanatuba Lake ($Q = 0.256$) (Fig. 4). The possible migration
408 model to explain the membership proportion shared between Manicoré and Porto Velho
409 will be discussed later in the paper. All localities, however, are characterized by high
410 levels of gene flow between them (Table 2).

411 We did not observe genetic differentiation ($F_{ST} = 0.003$; $P = 0.586$) between the
412 samples of *P. punctifer* from the Mamoré/Guaporé sub-basin and the lower Madeira
413 sub-basin based on microsatellites data (AMOVA Table S6). However, the genetic
414 differentiation was very high ($\Phi_{ST} = 0.391$, $P < 0.001$) for COI gene data (AMOVA
415 Table S7) (according to the scale of Wright, 1978). This discrepancy can be explained

416 by (1) different mutation rates of nuclear DNA and mtDNA; (2) differences in effective
417 population sizes of nuclear DNA (bi-parental inheritance of a diploid genome) and
418 mtDNA (uniparental inheritance of a haploid genome) loci, and thus strength of drift;
419 (3) the behavioral differences of movement and dispersal between males and females
420 with the possible existence of more sedentary females (Godinho et al., 2007).

421 Although there was no evidence of genetic differentiation (F_{ST} ; Table 2)
422 between samples collected in the Carapanatuba Lake and other localities, we observed
423 that the Lake is part of another cluster as seen in STRUCTURE and DAPC analyses
424 (Figs. 4 and 5). Top predator species of *Pseudoplatystoma* extensively use floodplain
425 lakes for foraging and growth; they can remain in the lakes during the dry season period
426 until the next flood pulse (Barthem & Goulding, 1997). The permanence of individuals
427 of *P. punctifer* in the Carapanatuba Lake during successive periods of drought and flood
428 pulse may explain the differences in the allelic frequencies observed in some loci, who
429 presented higher allelic frequencies in up to 63%, in comparison with individuals from
430 other locations (Table S4). Differences in allelic frequencies and private alleles
431 observed in each sub-basin (Table S5) too may explain the three clusters recovered by
432 STRUCTURE and DAPC (Figs. 4 and 5). Additionally, Carapanatuba is a black water
433 lake. Hydrochemical (different types of water, black, clear, and white) and ecological
434 gradients impose physiological constraints upon aquatic communities of the Amazon
435 (Junk et al., 1983; Saint-Paul et al., 2000; Petry et al., 2003). Hydrochemical differences
436 are known to contribute to the genetic differentiation of freshwater species in the
437 Amazonian aquatic environment (Beheregaray et al., 2015; Pires et al., 2018).
438 Hydrochemical differences, may, in part, explain genetic differentiation between
439 populations of *P. punctifer* from Mamoré/Guaporé and lower Madeira sub-basins,
440 especially the genetic differentiation observed among Carapanatuba Lake (CL) (that has
441 black water) for other localities (Fig. 4 and 5). However, this hypothesis needs to be
442 tested explicitly. The region covered by the Mamoré/Guaporé sub-basin (upstream of
443 rapids) is classified as a periodically flooded savanna with low amplitude flood pulses
444 (Junk et al., 2014). The Guaporé River also has clear water and flows into the Mamoré
445 River (Doria et al., 2018). The region of the lower Madeira sub-basin, downstream of
446 the rapids, is classified as a floodplain (várzeas) with white water. It is influenced by the
447 Amazon River with high amplitude flood pulses (Junk et al., 2014; Doria et al., 2018)

448 The variation of flood pulses is not uniformly distributed between the two sub-
449 basins (Junk et al., 2007). Therefore, we believe that the breeding season of *P. punctifer*

450 is synchronized with the hydrological periodicity differences of the Mamoré/Guaporé
451 and lower Madeira sub-basins. The breeding seasons for *P. punctifer* vary between
452 rivers that are upstream of the rapids: between October and December in the upper
453 Madre de Dios (Cañas & Pine, 2011) and between February and March in the upper
454 Mamoré River (Muñoz & Van Damme, 1998). In both rivers, these months coincide
455 with high water levels (Deza et al., 2005). However, there is no information about the
456 breeding seasons for *P. punctifer* in the lower Madeira sub-basin. The existence of
457 different breeding periods for *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) (Cañas
458 & Pine, 2011; Van Damme et al., 2011) was also proposed to explain the genetic
459 differentiation observed in different regions of Bolivian and Peruvian Amazon
460 (Carvajal-Vallejos et al., 2014).

461 The migration distance record for *P. punctifer* was 164 Km in the Xingú River in
462 the Amazon basin (Hahn et al., 2019). Where the median (minimum-maximum)
463 distances moved were 25 km (11–164 km) and 20 km (10–63 km) upstream and
464 downstream the rapids, respectively (Hahn et al., 2019). In this sense, the geographical
465 distance is also an important factor that can limit gene flow in *P. punctifer*. This was
466 confirmed in our study by the Mantel test which indicated a significant association
467 between genetic and geographic distance for mtDNA ($r = 0.905$, $P = 0.01$). Although the
468 Mantel test was not significant for nuDNA ($P = 0.15$) the correlation between
469 geographic and genetic distance was high ($r = 0.399$). The two-dimensional kernel
470 density estimation suggests continuous population genetic differentiation for nuDNA
471 and mtDNA data (Fig. 3). These clusters tend to dissolve into more clinal patterns of
472 genetic differentiation and can also be interpreted as a one-dimensional stepping stone
473 of population structure (Kimura & Weiss, 1964; Jombart et al., 2010). This pattern had
474 already been considered for *P. punctifer* (Telles et al., 2014); however, our analyses
475 showed how clusters (stepping stone of population structure) are distributed along the
476 sampling area (Fig. 5) (which was not clear in the previous study).

477

478 Connectivity

479 Migration rates are bi-directional but not symmetrical; we found that the
480 migration rate from Mamoré/Guaporé to lower Madeira was greater than in the opposite
481 direction (Fig. 6). Gene flow evaluated before the creation of hydroelectric dams can
482 also be observed in the membership proportion (Q) (Fig. 4). Cluster 1 was more
483 frequent upstream the rapids (Guajará-Mirim, $Q = 0.912$ and Cautário River $Q = 0.939$),

484 but also observed in the locations downstream the rapids, with greater frequency in
485 Porto Velho ($Q = 0.272$) (Fig. 4). The rapids restricted but did not block gene flow for *P.*
486 *punctifer*. The higher migration rate from Mamoré/Guaporé sub-basin to the lower
487 Madeira sub-basin (Fig. 6) can be explained by the passive transport of larvae and
488 juvenile individuals to the outgrowth areas that are closer to the mouth of the Madeira
489 River. This model of passive transport had already been proposed for *Colossoma*
490 *macropomum* (Cuvier, 1818) (Reinert & Winter, 2002) and was confirmed by genetic
491 analyses (Farias et al., 2010; Santos et al., 2018). The lower gene flow from the lower
492 Madeira sub-basin (downstream of rapids) to the Mamoré/Guaporé sub-basin (upstream
493 of rapids) can be explained by the rapids acting as barriers to the movement of *P.*
494 *punctifer*.

495 A biotelemetry study of Hahn et al. (2019) indicated that *P. punctifer* performed
496 bidirectional migration in the Xingu River rapids region with fishes crossing the rapids.
497 Downstream movement rates were higher than upstream rates. The slower upstream
498 movements were related to the presence of rapids in most of the study area, with higher
499 water velocities imposing a reduction in the upstream speed of fish movements and on
500 the other hand facilitating their downstream movements (Hahn et al., 2019). Although
501 the role of rapids in structuring the aquatic fauna of the Amazon basin is still poorly
502 known, studies have shown that they delimit species of pink river dolphins (Gravena et
503 al., 2014, 2015), lineages of crocodilians (Hrbek et al., 2008; Bittencourt et al., 2019),
504 populations of crocodilians (Muniz et al., 2018) and turtles (Santos et al., 2016; Oliveira
505 et al., 2019), and they also structure entire fish communities (Torrente-Vilara et al.,
506 2011). As observed in *P. punctifer*, waterfalls and rapids in the upper Madeira River
507 also restrict gene flow in other species of fish such as *Colossoma macropomum* (Farias
508 et al., 2010; Santos et al., 2018), and *Brachyplatystoma platynemum* (Boulenger, 1898)
509 (Ochoa et al., 2015).

510 Since their construction, the two dams on the Madeira effectively severed any
511 movement and all gene flow between the upstream and downstream populations. Any
512 inference of gene flow inferred from our data refers to the long-term historical
513 movement of alleles across the rapids which was possible before the closing of the
514 hydroelectric dams (Fig. 6), but which currently does not exist. Thus the results reported
515 in this study are important to evaluate the post-construction effects on genetic diversity
516 and connectivity of this species and other species as well.

517

518 Impact of hydroelectric dams

519 The hydroelectric dams of Jirau and Santo Antônio on the Madeira River (where
520 the rapids were located) are likely to completely disrupt the gene flow between the
521 populations of *P. punctifer* from the two sub-basins and tend to further increase the
522 level of genetic differentiation. Among the various environmental costs of river
523 damming, one is emphasized here: the blocking of genetic connectivity of migratory
524 fish species and other freshwater vertebrates, which may contribute to local extinction
525 (Fearnside, 2001). This is of marked concern in the Amazon basin where there are
526 projects to construct at least 30 new large hydropower dams (Fearnside, 2014; Faria et
527 al., 2015). Current studies indicate that hydropower dams operate as a physical barrier
528 to the movement of adult fish to upstream spawning grounds (Anderson & Maldonado-
529 Ocampo, 2011). Since the dams act as ecological and behavioral barriers, they preclude
530 adult fish from returning upstream to their feeding areas. This can also affect the young
531 fish because they may not reach their nursery sites (Carolsfeld et al., 2004; Pelicice et
532 al., 2015). Moreover, they are exposed to predators due to the increased transparency of
533 reservoir waters (Agostinho et al., 2007). In summary, in addition to blocking gene flow
534 along river courses, the environmental changes caused by hydroelectric dams elevate
535 the risk of local extinction of some species and the proliferation of others (Carolsfeld et
536 al., 2004). The construction of a large dam on a river regardless of the size of the river
537 most certainly will impact both terrestrial (nearby) and aquatic (long-range) biota as a
538 consequence of changes in the flood pulse, loss of habitats, change in the hydrochemical
539 parameters of water (Vannote et al., 1980; Junk et al., 1989), and the blockage of the
540 migration routes (Barthem & Goulding, 1997; McAllister et al., 2001).

541 Our analysis has revealed that several factors may be contributing to the genetic
542 differentiation observed along the sub-basins of lower Madeira and Mamoré/Guaporé.
543 Among these factors, we highlight isolation-by-distance (given that the species is
544 partially migratory), the restricted gene flow from downstream to upstream, and
545 hydrochemical and ecological heterogeneity throughout the study area. Additional
546 studies are needed to understand the pattern of genetic differentiation associated with
547 different types of water for *P. punctifer* in the Amazon basin. Considering the economic
548 and ecological importance of *P. punctifer*, we believe that the results of this study can
549 become an important contribution to appropriate conservation and management policies
550 for the species in sub-basins of Madeira and Mamoré/Guaporé.

551

552 ***Acknowledgements***

553

554 This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
555 Tecnológico (CNPq) (stand rate from ASCM) and Fundação de Amparo a Pesquisa do
556 estado do Amazonas (FAPEAM) J. S. B. Protocolo 8058.UNI300.276.08112012.
557 IBAMA granted the Permissions (N8 s 130 and 14278-1) and SISBIO (solicitation N°
558 50486). We would also like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
559 Nível Superior (CAPES) and CNPq (Process: 141556/20170) for the scholarship
560 granted to A. S. C. M. during study this study. This work is a part of ASCM PhD thesis
561 in the Genetics, Conservation in Evolutionary Biology program of INPA.

562

563 **Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

564

References

- Agostinho, A. A., E. E. Marques, C. S. Agostinho, D. A. De Almeida, R. J. De Oliveira, & J. R. B. De Melo, 2007. Fish ladder of Lajeado Dam: Migrations on one-way routes? *Neotropical Ichthyology* 5: 121–130.
- Anderson, E. P., & J. A. Maldonado-Ocampo, 2011. A Regional perspective on the diversity and conservation of tropical andean fishes. *Conservation Biology* 25: 30–39.
- Barthem, R., & M. Goulding, 1997. The catfish connection: ecology, migration, and conservation of Amazon predators. Columbia University Press.
- Batista, J. S., I. P. Farias, K. Formiga-Aquino, A. C. B. Sousa, & J. A. Alves-Gomes, 2010. DNA microsatellite markers for “dourada” (*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. *Conservation Genetics Resources* 2: 5–10.
- Beheregaray, L. B., G. M. Cooke, N. L. Chao, & E. L. Landguth, 2015. Ecological speciation in the tropics: Insights from comparative genetic studies in Amazonia. *Frontiers in Genetics* 5: 1–19.
- Benjamini, Y., & Y. Hochberg, 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57: 289–300.
- Bittencourt, P. S., Z. Campos, F. de L. Muniz, B. Marioni, B. C. Souza, R. Da Silveira, B. de Thoisy, T. Hrbek, & I. P. Farias, 2019. Evidence of cryptic lineages within a small South American crocodilian: the Schneider’s dwarf caiman *Paleosuchus trigonatus* (Alligatoridae: Caimaninae). *PeerJ* 7: e6580, <https://peerj.com/articles/6580>.
- Buitrago-Suárez, A. U., & B. M. Burr, 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa* 1512: 1–38.
- Cañas, C. M., & W. E. Pine, 2011. Documentation of the temporal and spatial patterns of pimelodidae catfish spawning and larvae dispersion in the madre de Dios River (Peru): Insights for conservation in the Andean-Amazon headwaters. *River Research and Applications* 27: 602–611.
- Carolsfeld, J., B. Harvey, C. Ross, & A. Baer, 2004. Migratory fishes of south America: Biology, fisheries, and conservation status. The World Bank.
- Carvajal-Vallejos, F. M., F. Duponchelle, E. Desmarais, F. Cerqueira, S. Querouil, J. Nuñez, C. García, & J. F. Renno, 2014. Genetic structure in the Amazonian catfish *Brachyplatystoma rousseauxii*: Influence of life history strategies. *Genetica* 142: 323–336.

- Castro-Conde, I., & J. De Uña-Álvarez, 2014. sgof: An r package for multiple testing problems. *R Journal* 6: 96–113.
- Cella-Ribeiro, A., G. Torrente-Vilara, D. B. D. . Hungria, & D. M. Oliveira, 2013. As corredeiras do Rio Madeira In Queiroz, L. J., G. Torrente-Vilara, W. M. Ohara, T. Pires, J. Zuanon, & C. R. C. Doria (eds), *Peixes do rio Madeira*. Editora Diaeto, São Paulo, Brazil: 56–63.
- DeWoody, J. A., & J. C. Avise, 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56: 461–473.
- Deza, S. A. T., R. S. A. Bazán, & Z. G. M. Culquichicón, 2005. Bioecología y pesquería de *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766; Pisces), doncella, en la región Ucayali. *Folia Amazónica* 14: 5–18.
- Doria, C. R. C., F. Duponchelle, M. A. L. Lima, A. Garcia, F. M. Carvajal-Vallejos, C. C. Méndez, M. F. Catarino, C. E. de C. Freitas, B. Vega, G. Miranda-Chumacero, & P. A. Van Damme, 2018. Review of Fisheries Resource Use and Status in the Madeira River Basin (Brazil, Bolivia, and Peru) Before Hydroelectric Dam Completion. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture Taylor & Francis* 26: 494–514.
- Doria, C. R. C., & M. A. L. Lima, 2015. *Rio Madeira: Seus peixes e sua pesca*. EDUFRO. Co-edición: RiMa Editora., Porto Velho.
- Earl, D. A., & B. M. vonHoldt, 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- Evanno, G., S. Regnaut, & J. Goudet, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Excoffier, L., & H. E. L. Lischer, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, & J. M. Quattro, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Falush, D., M. Stephens, & J. K. Pritchard, 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.
- Faria, F. A. M., P. Jaramillo, H. O. Sawakuchi, J. E. Richey, & N. Barros, 2015. Estimating greenhouse gas emissions from future Amazonian hydroelectric reservoirs. *Environmental Research Letters IOP Publishing* 10: 124019.
- Farias, I. P., J. P. Torrico, C. García-Dávila, M. D. C. F. Santos, T. Hrbek, & J.-F.

- Renno, 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 1129–1135.
- Fearnside, P. M., 2001. Environmental Impacts of Brazil's Tucuruí Dam: Unlearned Lessons for Hydroelectric Development in Amazonia. *Environmental Management* 27: 377–396.
- Fearnside, P. M., 2014. Impacts of Brazil's Madeira River Dams: Unlearned lessons for hydroelectric development in Amazonia. *Environmental Science and Policy Elsevier Ltd* 38: 164–172.
- Fearnside, P. M., 2016. Greenhouse Gas Emissions From Hydroelectric Dams in Tropical Forests In Lehr, J. H., J. Keeley, & B. Kingery (eds), *Alternative Energy and Shale Gas Encyclopedia*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA: 426–436.
- Frankham, R., J. D. Ballou, & D. A. Briscoe, 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- García-Dávila, C., F. Duponchelle, D. Castro-Ruiz, J. Villacorta, S. Quérouil, W. Chota-Macuyama, J. Núñez, U. Römer, F. Carvajal-Vallejos, & J. F. Renno, 2013. Molecular identification of a cryptic species in the Amazonian predatory catfish genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1962) from Peru. *Genetica* 141: 347–358.
- Godinho, A. L., B. Kynard, & H. P. Godinho, 2007. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environmental Biology of Fishes* 80: 421–433.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* 86: 485–486.
- Gravena, W., V. M. F. da Silva, M. N. F. da Silva, I. P. Farias, & T. Hrbek, 2015. Living between rapids: genetic structure and hybridization in botos (Cetacea: Iniidae: *Inia* spp.) of the Madeira River, Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* 144: 764–777.
- Gravena, W., I. P. Farias, M. N. F. da Silva, V. M. F. da Silva, & T. Hrbek, 2014. Looking to the past and the future: were the Madeira River rapids a geographical barrier to the boto (Cetacea: Iniidae)? *Conservation Genetics* 15: 619–629.
- Hahn, L., E. G. Martins, L. D. Nunes, L. F. da Câmara, L. S. Machado, & D. Garrone-Neto, 2019. Biotelemetry reveals migratory behaviour of large catfish in the Xingu River, Eastern Amazon. *Scientific Reports* 9: 1–15.
- Hey, J., 2010. Isolation with migration models for more than two populations. *Molecular Biology and Evolution* 27: 905–920.
- Hrbek, T., W. R. Vasconcelos, G. Rebelo, & I. P. Farias, 2008. Phylogenetic

relationships of South American Alligatorids and the Caiman of Madeira River. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 309A: 588–599.

- Jakobsson, M., & N. A. Rosenberg, 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801–1806.
- Jombart, T., 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403–1405.
- Jombart, T., S. Devillard, & F. Balloux, 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11: 94.
- Jonsson, B., & N. Jonsson, 1993. Partial migration: niche shift versus sexual maturation in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3: 348–365.
- Junk, W. J., P. B. Bayley, & R. E. Sparks, 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. In D. P. Dodge (Ed.) *Proceedings of the International Large River Symposium*. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 106: 110–127.
- Junk, W. J., M. T. F. Piedade, R. Lourival, F. Wittmann, P. Kandus, L. D. Lacerda, R. L. Bozelli, F. A. Esteves, C. Nunes da Cunha, L. Maltchik, J. SchÖngart, Y. Schaeffer-Novelli, & A. A. Agostinho, 2014. Brazilian wetlands: Their definition, delineation, and classification for research, sustainable management, and protection. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 24: 5–22.
- Junk, W. J., G. M. Soares, & F. M. Carvalho, 1983. Distribution of fish species in a lake of the Amazon river floodplain near Manaus (Lago Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. *Amazoniana: Limnologia et oecologia regionalis systemae fluminis Amazonas* 7: 397–431.
- Junk, W. J., M. G. M. Soares, & P. B. Bayley, 2007. Freshwater fishes of the Amazon River basin: their biodiversity, fisheries, and habitats. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 10: 153–173.
- Kimura, M., & G. H. Weiss, 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561–576.
- MacArthur, R. H., E. O. Wilson, & W. MacArthur, 1967. *The theory of island biogeography*. Princeton University Press. 224.
- McAllister, M. K., E. K. Pikitch, & E. A. Babcock, 2001. Using demographic methods to construct Bayesian priors for the intrinsic rate of increase in the Schaefer model and implications for stock rebuilding. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 1871–1890.
- Muniz, F. L., Z. Campos, S. M. Hernández Rangel, J. G. Martínez, B. C. Souza, B. De

- Thoisy, R. Botero-Arias, T. Hrbek, & I. P. Farias, 2018. Delimitation of evolutionary units in Cuvier's dwarf caiman, *Paleosuchus palpebrosus* (Cuvier, 1807): insights from conservation of a broadly distributed species. *Conservation Genetics* 19: 599–610.
- Muñoz, H., & P. A. Van Damme, 1998. Parámetros de reproducción de 4 especies de peces comerciales (*Pseudoplatystoma fasciatum* , *P . tigrinum* , *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomum*) en la cuenca del río Ichilo (Bolivia). *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental* 4: 39–54.
- Ochoa, L. E., L. H. G. Pereira, G. J. Costa-Silva, F. F. Roxo, J. S. Batista, K. Formiga, F. Foresti, & C. Oliveira, 2015. Genetic structure and historical diversification of catfish *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with implications for its conservation. *Ecology and Evolution* 5: 2005–2020.
- Oliveira, J. dos A., I. P. Farias, G. C. Costa, & F. P. Werneck, 2019. Model-based riverscape genetics: disentangling the roles of local and connectivity factors in shaping spatial genetic patterns of two Amazonian turtles with different dispersal abilities. *Evolutionary Ecology* 33: 273–298.
- Ortiz, M. F., 2010. Validação Do Dna Barcoding Como Identificador De Espécies: Um Estudo De Ampla Amostragem Com O Gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes; Pimelodidae) Na Amazônia. M.Sc. Thesis. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, (AM), Brasil. .
- Paithankar, K. R., & K. S. Prasad, 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic acids research* 19: 1346.
- Peakall, R., & P. E. Smouse, 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Pellicice, F. M., P. S. Pompeu, & A. A. Agostinho, 2015. Large reservoirs as ecological barriers to downstream movements of Neotropical migratory fish. *Fish and Fisheries* 16: 697–715.
- Pereira, L. H. G., F. Foresti, & C. Oliveira, 2009. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. *Ecology of Freshwater Fish* 18: 215–225.
- Petry, P., P. B. Bayley, & D. F. Markle, 2003. Relationships between fish assemblages, macrophytes and environmental gradients in the Amazon River floodplain. *Journal of Fish Biology* 63: 547–579.
- Pires, T., E. Borghezian, V. Machado, D. Powell, C. Röpke, C. Oliveira, J. Zuanon, & I. Farias, 2018. Testing Wallace's intuition: water type, reproductive isolation and divergence in an Amazonian fish. *Journal of Evolutionary Biology* 31: 882–892.
- Platt, A., R. Woodhall, & A. George Jr, 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques* 43: 58–62.

- Pritchard, J. K., M. Stephens, & P. Donnelly, 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945–959.
- R Core, T., 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
- Rahel, F. J., 2007. Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology* 52: 696–710.
- Reinert, T. R., & K. A. Winter, 2002. Sustainability of harvested pacú (*Colossoma macropomum*) populations in the northeastern Bolivian Amazon. *Conservation Biology* 16: 1344–1351.
- Rosenberg, N. A., 2003. DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137–138.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S. E. Ramos-Onsins, & A. Sánchez-Gracia, 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299–3302.
- Saint-Paul, U., J. Zuanon, M. A. Villacorta Correa, M. García, N. N. Fabré, U. Berger, & W. J. Junk, 2000. Fish communities in central Amazonian white and blackwater floodplains. *Environmental Biology of Fishes* 57: 235–250.
- Salzburger, W., G. B. Ewing, & A. Von Haeseler, 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20: 1952–1963.
- Sambrook, J., & D. Russell, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Santos, M. da C. F., T. Hrbek, & I. P. Farias, 2018. A Multilocus Approach to Understanding Historical and Contemporary Demography of the Keystone Floodplain Species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Frontiers in Genetics* 9: 17.
- Santos, R. C., M. S. V. Neves, L. A. S. Monjeló, P. C. M. Andrade, J. Pantoja-Lima, P. H. G. Oliveira, R. C. Vogt, J. C. B. Pezzuti, J. W. Sites, T. Hrbek, & I. P. Farias, 2016. Testing the Effects of Barriers on the Genetic Connectivity in *Podocnemis erythrocephala* (Red-Headed Amazon River Turtle): Implications for Management and Conservation. *Chelonian Conservation and Biology* 15: 12–22.
- Saulo-Machado, A. C., K. M. Formiga, M. F. Ortiz, A. C. B. Sousa, J. A. Alves-Gomes, & J. S. Batista, 2011. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). *Conservation Genetics Resources* 3: 307–310.
- Slatkin, M., 1985. Gene Flow in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and*

Systematics 16: 393–430.

- Telles, M. P. C., R. G. Collevatti, R. S. Braga, L. B. S. Guedes, T. G. Castro, M. C. Costa, N. J. Silva-Júnior, R. B. Barthem, & J. A. F. Diniz-Filho, 2014. Geographical genetics of *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) (Siluriformes, Pimelodidae) in the Amazon Basin. *Genetics and Molecular Research* 13: 3656–3666.
- Terencio, M. L., C. H. Schneider, & J. I. R. Porto, 2012. Molecular signature of the D-loop in the brown pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. *Journal of Fish Biology* 81: 110–124.
- Torrente-Vilara, G., J. Zuanon, F. Leprieur, T. Oberdorff, & P. A. Tedesco, 2011. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). *Ecology of Freshwater Fish* 20: 588–597.
- Van Damme, P. A., J. C.-V. F. M. Camacho, H. Muñoz, & J. Coronel, 2011. Peces migratorios de la Amazonía boliviana. In Van Damme, P. A. Carvajal-Vallejos, F. M. Molina, J. (ed), *Los Peces y Delfines de la Amazonía Boliviana: Hábitats, Potencialidades y Amenazas*. INIA editorial, Cochabamba, Bolivia,: 149–200.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, & P. Shipley, 2004. MicroChecker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.
- Vannote, R. L., G. W. Minshall, K. W. Cummins, J. R. Sedell, & C. E. Cushing, 1980. The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37: 130–137.
- Venables, W. N., & B. D. Ripley, 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Springer-Verlag New York.
- Ward, R. D., T. S. Zemplak, B. H. Innes, P. R. Last, & P. D. N. Hebert, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1847–1857.
- Winemiller, K. O., P. B. McIntyre, L. Castello, E. Fluet-Chouinard, T. Giarrizzo, S. Nam, I. G. Baird, W. Darwall, N. K. Lujan, I. Harrison, M. L. J. Stiassny, R. A. M. Silvano, D. B. Fitzgerald, F. M. Pelicice, A. A. Agostinho, L. C. Gomes, J. S. Albert, E. Baran, M. Petrere, C. Zarfl, M. Mulligan, J. P. Sullivan, C. C. Arantes, L. M. Sousa, A. A. Koning, D. J. Hoeinghaus, M. Sabaj, J. G. Lundberg, J. Armbruster, M. L. Thieme, P. Petry, J. Zuanon, G. T. Vilara, J. Snoeks, C. Ou, W. Rainboth, C. S. Pavanelli, A. Akama, A. Van Soesbergen, & L. Saenz, 2016. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. *Science* 351: 128–129.
- Wright, S., 1978. *Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations*. The University of Chicago Press, Chicago.

Tables

Table 1. Genetic diversity estimates of *Pseudoplatystoma punctifer* sampled from five localities for two sub-basins, screened for 10 microsatellite loci (*nuDNA*) and COI sequences (*mtDNA*).

Parameter of variation	Lower Madeira sub-basin			Mamoré/Guaporé sub-basin	
	Manicoré	Carapanatuba	Porto Velho	Guajará-Mirim	Cautário River
<i>nuDNA</i>					
<i>N</i>	30	17	20	23	9
<i>A</i>	7.2	6.000	6.500	7.300	4.900
<i>H_O</i>	0.519	0.517	0.532	0.520	0.522
<i>H_E</i>	0.564	0.548	0.596	0.591	0.567
<i>F_{IS}</i>	0.066	0.124	0.108	0.094	0.064
<i>mtDNA</i>					
<i>N</i>	30	17	19	21	9
<i>H</i>	4	5	5	2	3
<i>S</i>	5	4	5	1	2
<i>Hd</i>	0.356 ± 0.106	0.574 ± 0.127	0.620 ± 0.099	0.324 ± 0.108	0.417 ± 0.191
<i>π</i>	0.0012 ± 0.0004	0.0012 ± 0.0003	0.0018 ± 0.0005	0.0006 ± 0.0002	0.0008 ± 0.0004

N Number of samples, *A* number of alleles; *H_O* observed heterozygosity; *H_E* expected heterozygosity; *F_{IS}* inbreeding coefficient, *H* number of haplotypes, *S* number of variable sites, *Hd* haplotype diversity, *π* nucleotide diversity; *nuDNA* microsatellite and *mtDNA* COI gene.

Table 2 Pairwise comparison of Nm (above) and F_{ST} (below) values of *Pseudoplatystoma punctifer* sampled from five localities. Estimates based on 10 microsatellite loci.

Localities	Manicoré	Carapanatuba Lake	Porto Velho	Guajará-Mirim	Cautário River
Manicoré	-	inf	inf	38.09	6.59
Carapanatuba	-0.002	-	inf	inf	15.84
Porto Velho	-0.003	-0.004	-	83.07	7.29
Guajará-Mirim	0.012	-0.005	0.005	-	7.17
Cautário River	0.070	0.030	0.064	0.065	-

There were no observed significant values of F_{ST} after BH procedure for correction of P values and FDR ($P < 0.05$); inf: infinite. Localities of the lower Madeira sub-basin (downstream of rapids) are Manicoré, Carapanatuba Lake, and Porto Velho. Localities of Mamoré/Guaporé sub-basin (upstream of rapids) Guajará-Mirim and Cautário River.

Table 3 Pairwise comparison of Nm (above) and Φ_{st} (below) values of *Pseudoplatystoma punctifer* sampled from five localities. Estimates based on 536 pb of the mtDNA (COI).

Localities	Manicoré	Carapanatuba lake	Porto Velho	Guajará-Mirim	Cautário River
Manicoré	-	inf	12.25	0.60	0.43
Carapanatuba	-0.007	-	21.54	0.61	0.44
Porto Velho	0.039	0.022	-	1.78	1.11
Guajará-Mirim	0.453	0.449	0.219	-	5.50
Cautário River	0.538	0.529	0.310	0.083	-

Significant values of Φ_{st} after BH procedure for correction of P values and FDR ($P < 0.05$) in bold; inf: infinite. Localities of the lower Madeira sub-basin (downstream of rapids) Manicoré, Carapanatuba lake, and Porto Velho. Localities of Mamoré/Guaporé sub-basin (upstream of rapids) Guajará-Mirim and Cautário River.

Figure Captions

Fig. 1 Sampling localities of the *Pseudoplatystoma punctifer* used in this study. Sampling localities from the lower Madeira sub-basin, represented in blue (downstream of rapids) - MC, Manicoré; CL, Carapanatuba lake; and PV, Porto Velho. Sampling sites upstream of rapids: GM, Guajará-Mirim on the Mamoré River and CR, Cautário River which is a tributary of Guaporé River. The upper two dashed bars represent the Teotônio and Jirau waterfalls which were submerged by the Santo Antônio and Jirau hydroelectric dams indicated by yellow bars. The other dashed bar represents the Guajará-Mirim rapid, delimiting the Mamoré/Guaporé sub-basin represented in green.

Fig. 2 Maximum-likelihood haplotype network of the 11 haplotypes observed in 96 individuals of *Pseudoplatystoma punctifer*. The size of each haplotype is proportional to the number of individuals possessing that haplotype. Colors/shades denote the geographic distribution of these haplotypes.

Fig. 3 Isolation by distance (IBD) scatter plots showing the results of the Mantel test between the matrix of genetic distances and the matrix of geographic distances of 99 specimens of *Pseudoplatystoma punctifer* sampled between (2005–2009). Local density of points plotted using two-dimensional kernel density estimation. A line representing correlation (r) is shown; colors represent the relative density of points: blue low density, yellow medium density, red high density. **a** For nuDNA (microsatellite) data ($r = 0.536$, $P = 0.08$); **b** For mtDNA (COI) data ($r = 0.905$, $P = 0.01$).

Fig. 4 Bayesian inference of population structuring inferred in STRUCTURE. The Highest posterior probability and delta K is associated with three genetic clusters of *Pseudoplatystoma punctifer* in lower Madeira and Mamoré/Guaporé sub-basins. **a** Bar plot, each individual is represented by a vertical line. Each color indicates a genetic cluster based on genotypic similarities, the proportion of membership (Q) are shown above the below sampling localities; **b** Mean posterior probabilities of 20 runs for each K ($K = 3$; mean LnProb = -2766.165000) and **c** Delta K statistic.

Fig. 5 Discriminant analysis of principal components (DAPC) scatterplot for the five sampling localities of *Pseudoplatystoma punctifer*. MC, Manicoré; CL, Carapanatuba lake; and PV, Porto Velho (lower Madeira sub-basin); GM, Guajará-Mirim and CR, Cautário River (Mamoré/Guaporé sub-basin). The optimal number of principal components (PCs = 20) was retained as determined by DAPC cross-validation and 4 discriminant functions. PCA and DA eigenvalues of the analysis are displayed in insets. The graphs represent the individuals as dots and the groups as inertia ellipses. The colors correspond to the three clusters identified by STRUCTURE analysis (green; orange and blue).

Fig. 6 Schematic representation of the Population Migration (2NM) estimated in the program IMA2 using microsatellite (nuDNA) and mitochondrial (COI) (mtDNA) markers, arrows indicate the direction of gene flow and colours represent sub-basins as indicated in Figure 1.

Figures

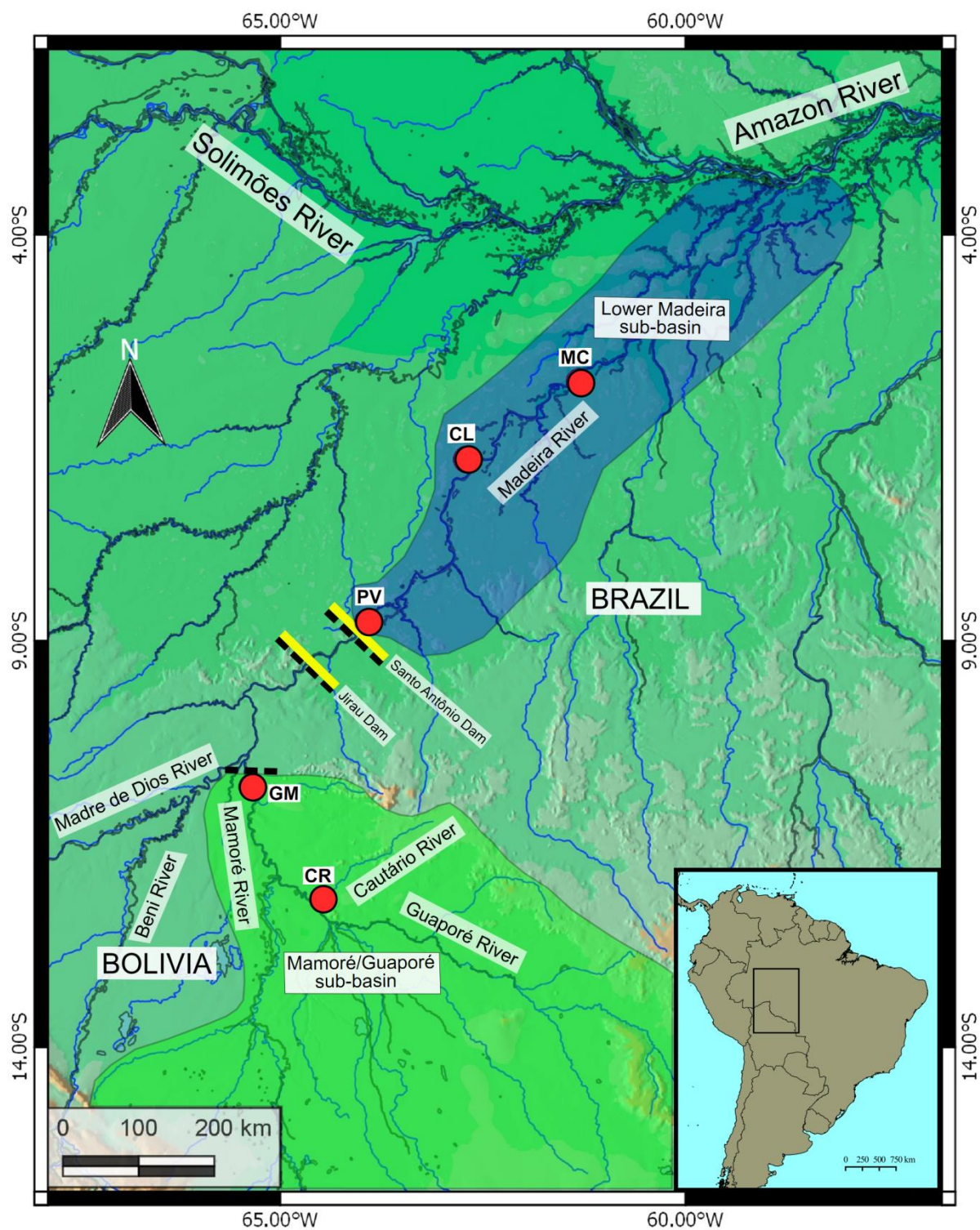


Fig.1

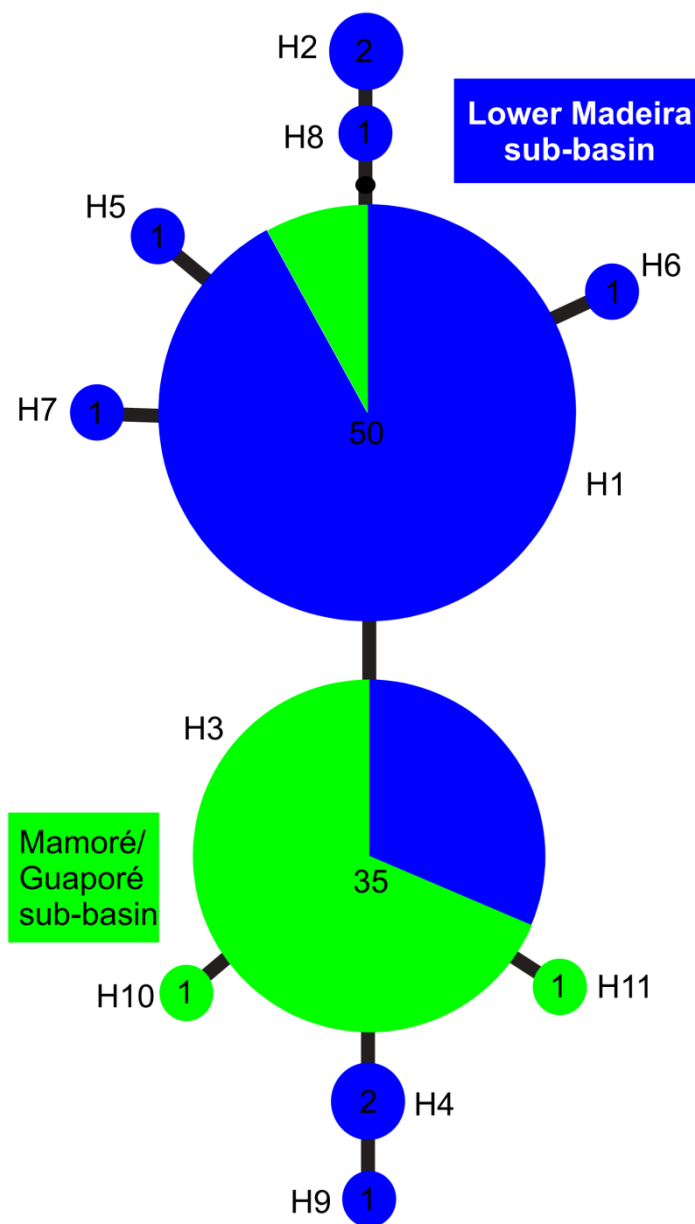


Fig.2

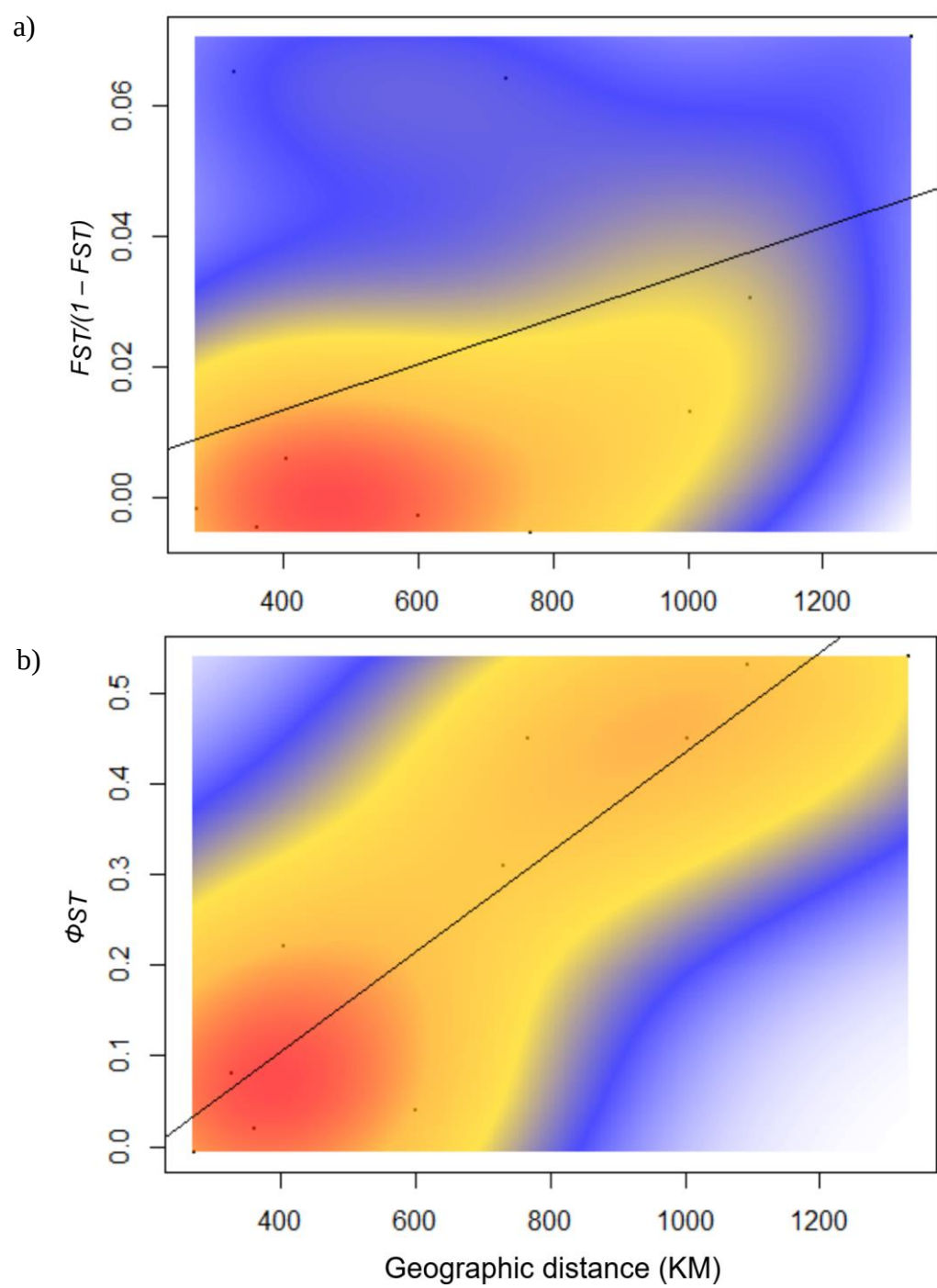


Fig.3

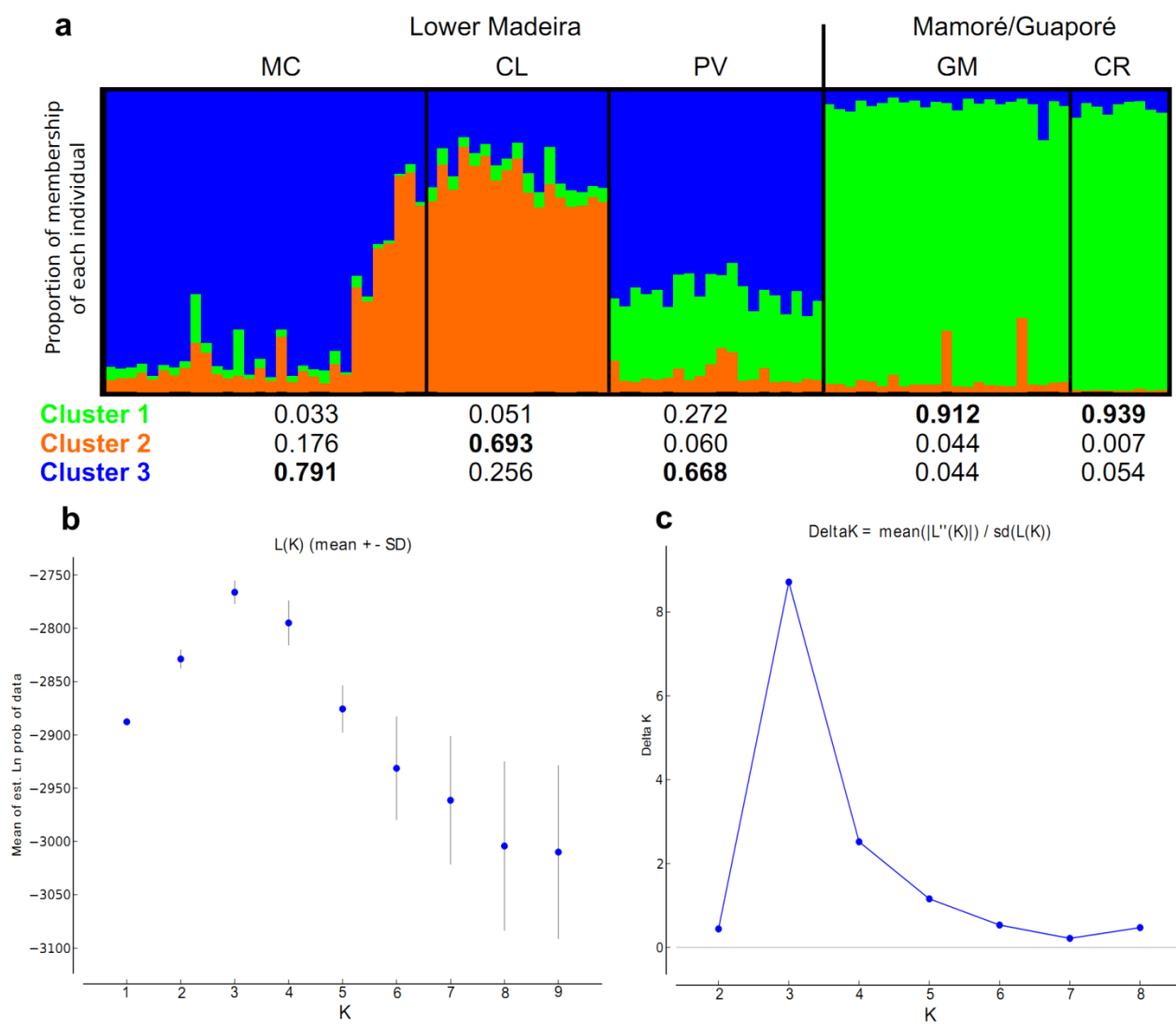


Fig.4

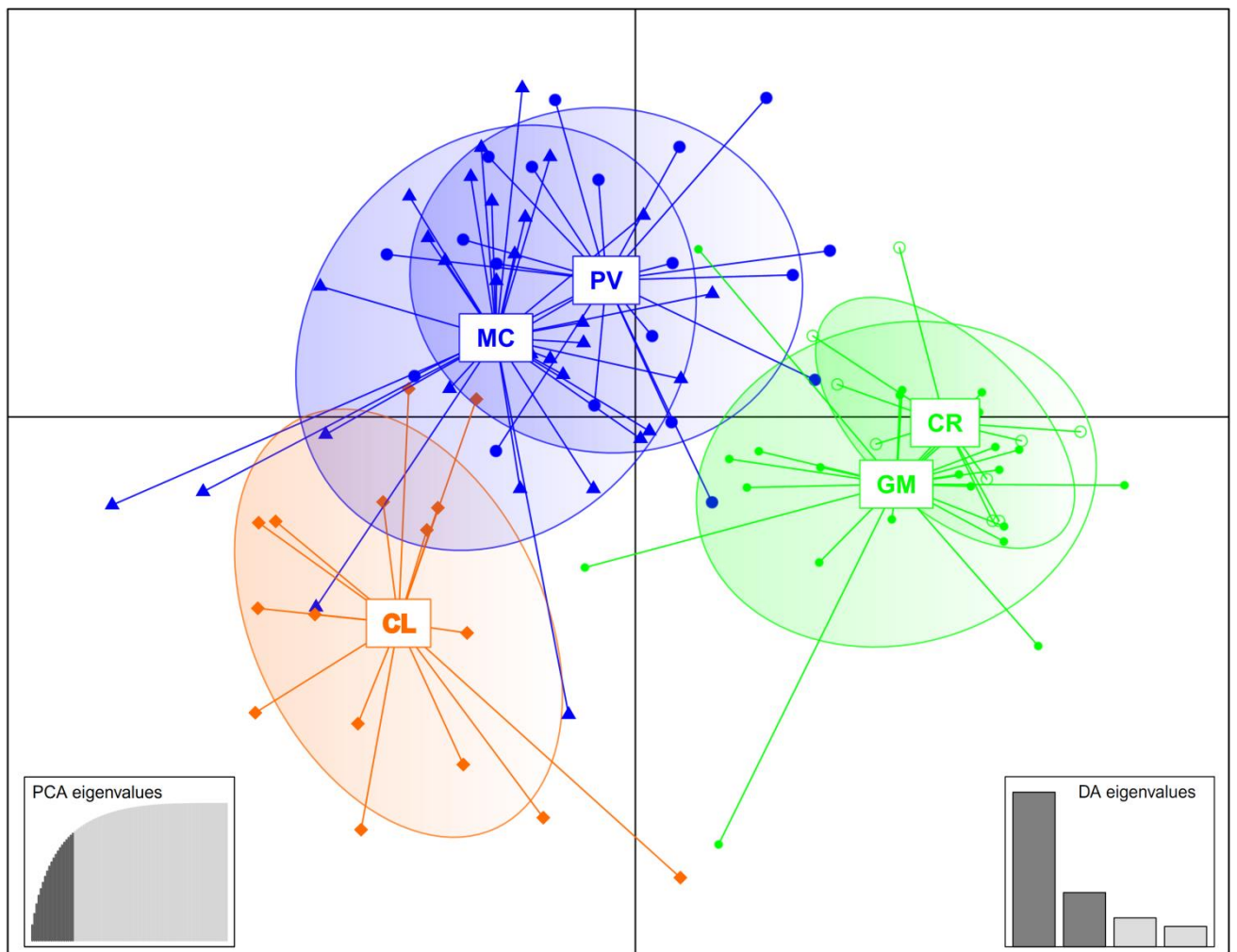


Fig.5

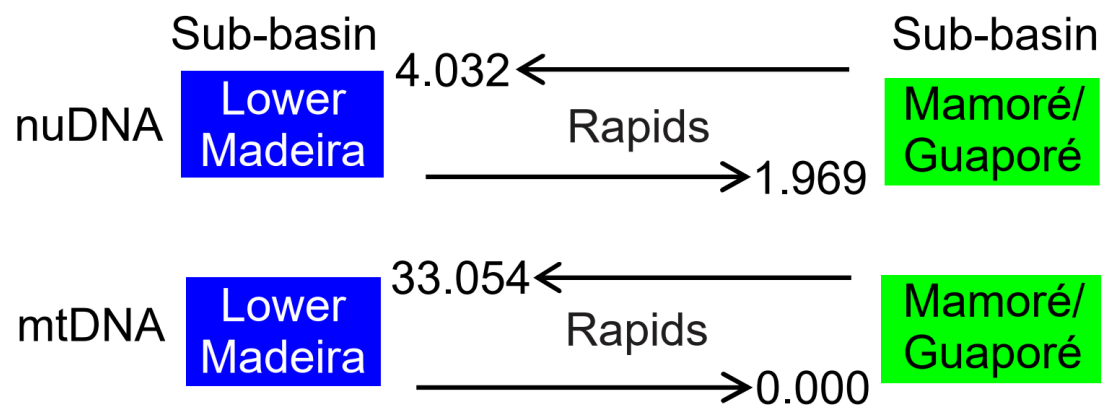


Fig.6

Electronic Supplementary Material

Table S1. Sampling information of *Pseudoplatystoma punctifer* of the five study locations. Sample number from the Collection of Genetic Resources of the National Institute of Amazonian Research (INPA) and the Collection of Animal Genetics Tissue of the Federal University of Amazonas (CTGA/UFAM) Manaus, Brazil.

Code	Sampling site	Sample number	Year of sampling	GenBank accession number
MC1	Manicoré	P 9706	2008	MN909863
MC2	Manicoré	P 9708	2008	MN909864
MC3	Manicoré	P 9709	2008	MN909865
MC4	Manicoré	P 9710	2008	MN909866
MC5	Manicoré	P 9711	2008	MN909867
MC6	Manicoré	P 9712	2008	MN909868
MC7	Manicoré	P 9713	2008	MN909869
MC8	Manicoré	P 9714	2008	MN909870
MC9	Manicoré	P 9715	2008	MN909871
MC10	Manicoré	P 9716	2008	MN909872
*MC11	Manicoré	P 9717	2008	GU570718
MC12	Manicoré	P 9718	2008	MN909873
MC13	Manicoré	P 9719	2008	MN909874
MC14	Manicoré	P 9721	2008	MN909875
MC15	Manicoré	P 9722	2008	MN909876
MC16	Manicoré	P 9723	2008	MN909877
MC17	Manicoré	P 9724	2008	MN909878
MC18	Manicoré	P 9725	2008	MN909879
MC19	Manicoré	P 9692	2008	MN909880
MC20	Manicoré	P 9693	2008	MN909881
MC21	Manicoré	P 9694	2008	MN909882
MC22	Manicoré	P 9697	2008	MN909883
MC23	Manicoré	P 9703	2008	MN909884
MC24	Manicoré	P 9695	2008	MN909885
MC25	Manicoré	P 9698	2008	MN909886
MC26	Manicoré	P 9699	2008	MN909887
MC27	Manicoré	P 9700	2008	MN909888
MC28	Manicoré	P 9701	2008	MN909889
*MC29	Manicoré	P 9704	2008	GU570720
*MC30	Manicoré	P 9705	2008	GU570719
CL1	Carapanatuba Lake	P 33110	2009	MN909890
CL2	Carapanatuba Lake	P 33111	2009	MN909891
CL3	Carapanatuba Lake	P 33112	2009	MN909892
CL4	Carapanatuba Lake	P 33113	2009	MN909893
CL5	Carapanatuba Lake	P 33114	2009	MN909894
CL6	Carapanatuba Lake	P 33115	2009	MN909895
CL7	Carapanatuba Lake	P 33116	2009	MN909896
CL8	Carapanatuba Lake	P 33117	2009	Not sequenced
CL9	Carapanatuba Lake	P 33118	2009	MN909897
CL10	Carapanatuba Lake	P 33119	2009	MN909898
CL11	Carapanatuba Lake	P 33120	2009	MN909899
CL12	Carapanatuba Lake	P 33121	2009	MN909900
CL13	Carapanatuba Lake	P 33122	2009	MN909901
CL14	Carapanatuba Lake	P 33123	2009	MN909902
CL15	Carapanatuba Lake	P 33124	2009	MN909903
CL16	Carapanatuba Lake	P 33125	2009	MN909904
CL17	Carapanatuba Lake	P 33126	2009	MN909905
CL18	Carapanatuba Lake	P 33127	2009	MN909906
PV1	Porto Velho	P 7551	2007	MN909907
PV2	Porto Velho	P 7552	2007	MN909908

PV3	Porto Velho	P 7554	2007	MN909909
PV4	Porto Velho	P 7557	2007	MN909910
PV5	Porto Velho	P 7558	2007	MN909911
PV6	Porto Velho	P 7562	2007	MN909912
PV7	Porto Velho	P 7608	2007	MN909913
PV8	Porto Velho	P 7609	2007	MN909914
PV9	Porto Velho	P 7610	2007	MN909915
PV10	Porto Velho	P 7611	2007	MN909916
PV11	Porto Velho	P 14708	2009	MN909917
PV12	Porto Velho	P 14709	2009	MN909918
*PV13	Porto Velho	P 5039	2006	GU570722
*PV14	Porto Velho	P 5040	2006	GU570723
PV15	Porto Velho	P 9256	2008	Not sequenced
PV16	Porto Velho	P 9257	2008	MN909919
*PV17	Porto Velho	P 9259	2008	GU570721
PV18	Porto Velho	P 9260	2008	MN909920
*PV19	Porto Velho	P 9261	2008	GU570725
*PV20	Porto Velho	P 9262	2008	GU570724
GM1	Guajará Mirim	P 5048	2006	MN909921
*GM2	Guajará Mirim	P 5049	2006	GU570717
GM3	Guajará Mirim	P 5050	2006	MN909922
*GM4	Guajará Mirim	P 8824	2008	GU570712
*GM5	Guajará Mirim	P 8837	2008	GU570713
*GM6	Guajará Mirim	P 8847	2008	GU570714
*GM7	Guajará Mirim	P 9160	2008	GU570715
*GM8	Guajará Mirim	P 9270	2008	GU570716
GM9	Guajará Mirim	P 9283	2008	MN909923
GM10	Guajará Mirim	P 14703	2009	MN909924
GM11	Guajará Mirim	P 33128	2009	MN909925
GM12	Guajará Mirim	P 33129	2009	MN909926
GM13	Guajará Mirim	P 33130	2009	MN909927
GM14	Guajará Mirim	P 33131	2009	MN909928
GM15	Guajará Mirim	P 33132	2009	MN909929
GM16	Guajará Mirim	P 33133	2009	MN909930
GM17	Guajará Mirim	P 33134	2009	MN909931
GM18	Guajará Mirim	P 33135	2009	MN909932
GM19	Guajará Mirim	P 33136	2009	MN909933
GM20	Guajará Mirim	P 33137	2009	Not sequenced
GM21	Guajará Mirim	P 33138	2009	MN909934
GM23	Guajará Mirim	P 33139	2009	MN909935
CR1	Cautário River	P 2355	2005	MN909936
CR2	Cautário River	P 2356	2005	MN909937
CR3	Cautário River	P 2357	2005	MN909938
CR4	Cautário River	P 2358	2005	MN909939
CR5	Cautário River	P 2359	2005	MN909940
CR6	Cautário River	P 2360	2005	MN909941
CR7	Cautário River	P 2361	2005	MN909942
CR8	Cautário River	P 14706	2009	MN909943
CR9	Cautário River	P 33140	2009	MN909944

* Sequences were recovered from GenBank (Ortiz, 2010).

Table S2. Matrix of genotypes from 10 microsatellite loci of *Pseudoplatystoma punctifer* sampled in the five study localities.

Genotypes will be available after final acceptance.

Table S3. Genetic diversity indices across the 10 microsatellite loci used for the analysis of *Pseudoplatystoma punctifer* from 5 localities studied, which were also grouped in lower Madeira sub-basin (downstream of rapids) (N=67) and Mamoré/Guaporé sub-basin (upstream of rapids) (N= 32). Number of individuals (N). Manicoré, MC, N=30; Carapanatuba lake, CL, N=17; Porto Velho, PV, N=20; Guajará-Mirim, GM, N=23 and Cautário River, CR, N=9.

Loci and parameter	Sub-basins		Localities				
	Lower Madeira	Mamoré/Guaporé	Lower Madeira			Mamoré/Guaporé	
			MC	CL	PV	GM	CR
Ppu1							
A	16	12	10	8	11	11	6
Ar	11.735	11.738	6.976	6.495	6.698	6.739	6.000
H _O	0.800	0.625	0.800	0.866	0.750	0.652	0.555
H _E	0.813	0.769	0.787	0.782	0.731	0.738	0.741
F _{IS}	0.017	0.190	-0.016	-0.108	-0.026	0.117	0.250
HWE			0.552	0.302	0.593	0.040	0.107
R			-	-	-	-	-
Ppu2							
A	13	10	12	9	11	9	8
Ar	12.048	10.000	8.123	7.637	8.437	7.557	8.000
H _O	0.848	0.733	0.833	0.938	0.800	0.714	0.777
H _E	0.887	0.855	0.864	0.838	0.856	0.849	0.772
F _{IS}	0.044	0.145	0.036	-0.119	0.066	0.159	-0.008
HWE			0.778	0.541	0.342	0.004	0.324
R			-	-	-	-	-
Ppu4							
A	19	20	17	14	14	19	9
Ar	16.714	19.804	11.130	10.044	10.340	11.996	9.000
H _O	0.863	0.870	0.933	0.765	0.842	0.954	0.666
H _E	0.923	0.937	0.919	0.884	0.899	0.926	0.790
F _{IS}	0.066	0.072	-0.015	0.135	0.063	-0.031	0.156
HWE			0.599	0.021	0.350	0.181	0.055
R			-	-	-	-	-
Ppu5							
A	9	8	6	4	5	7	4
Ar	6.324	7.926	3.613	2.845	3.667	5.167	4.000
H _O	0.353	0.406	0.310	0.235	0.526	0.434	0.333
H _E	0.402	0.671	0.334	0.216	0.561	0.644	0.636
F _{IS}	0.121	0.399	0.071	-0.088	0.062	0.325	0.476
HWE			0.369	1.000	0.142	0.001	0.011
R			-	-	-	0.127	-
Ppu7							
A	5	5	5	5	5	5	4
Ar	4.913	5.000	3.591	4.306	4.328	4.709	4.000
H _O	0.569	0.741	0.551	0.563	0.600	0.681	0.888
H _E	0.649	0.717	0.636	0.639	0.645	0.715	0.673
F _{IS}	0.125	-0.034	0.132	0.119	0.070	0.046	-0.321
HWE			0.412	0.529	0.510	0.294	0.606
R			-	-	-	-	-
Ppu8							
A	2	2	2	2	2	2	1
Ar	1.986	2.000	1.514	1.786	1.844	1.679	Mono
H _O	0.074	0.066	0.066	0.000	0.150	0.095	-
H _E	0.099	0.065	0.064	0.111	0.139	0.091	-
F _{IS}	0.253	-0.018	-0.034	1.000	-0.081	-0.050	-
HWE			1.000	0.030	1.000	1.000	-
R			-	-	-	-	-

Table S3. Continuanee.

Loci and Parameter	Sub-basins		Localities				
	Lower Madeira	Mamoré/ Guaporé	Lower Madeira			Mamoré/Guaporé	
			MC	CL	PV	GM	CR
Ppu11							
A	4	3	3	3	4	3	2
Ar	3.424	2.937	2.195	2.448	2.900	2.175	2.000
H _O	0.261	0.156	0.233	0.200	0.350	0.173	0.111
H _E	0.303	0.148	0.209	0.184	0.468	0.162	0.105
F _{IS}	0.138	-0.054	-0.114	-0.084	0.251	-0.076	-0.059
HWE			1.000	1.000	0.460	1.000	1.000
R			-	-	-	-	-
Ppu12							
A	6	6	6	5	3	5	4
Ar	5.556	5.935	4.431	4.200	2.842	3.474	4.000
H _O	0.476	0.516	0.500	0.667	0.300	0.454	0.666
H _E	0.656	0.548	0.664	0.698	0.454	0.500	0.611
F _{IS}	0.275	0.061	0.247	0.045	0.339	0.091	-0.091
HWE			0.166	0.001	0.062	0.050	0.842
R			-	-	-	-	-
Ppu13							
A	8	4	6	6	6	4	3
Ar	6.657	4.000	5.083	4.858	5.045	3.782	3.000
H _O	0.546	0.531	0.607	0.438	0.550	0.521	0.555
H _E	0.769	0.671	0.703	0.570	0.684	0.681	0.593
F _{IS}	0.291	0.211	0.137	0.233	0.196	0.234	0.062
HWE			0.035	0.332	0.153	0.055	0.631
R			-	-	-	-	-
Ppu14							
A	6	13	5	4	4	8	8
Ar	5.112	12.500	3.761	3.489	3.406	4.981	8.000
H _O	0.421	0.562	0.357	0.500	0.450	0.521	0.666
H _E	0.519	0.671	0.459	0.559	0.521	0.600	0.747
F _{IS}	0.189	0.165	0.221	0.105	0.137	0.131	0.107
HWE			0.180	0.125	0.220	0.231	0.123
R			-	-	-	-	-

Table S4. Loci that presented the higher differences of allelic frequency for individuals from Carapanatuba Lake in relation to other localities.

Loci	Allele	Manicoré	Carapanatuba Lake	Porto Velho	Guajará- Mirim	Cautário River
Ppu1	206	5%	23%	3%	4%	0%
	218	8%	33%	5%	2%	0%
Ppu12	267	3%	23%	0%	0%	6%
	273	13%	34%	8%	2%	0%
Ppu13	237	14%	63%	5%	0%	0%

Table S5. Private alleles count across the 10 microsatellite loci of *Pseudoplatystoma punctifer* per sub-basin and sampled locality.

SUB-BASINS	LOWER MADEIRA			MAMORÉ/GUAPORÉ		Total private alleles per locus
Localities and Genotyped loci	Manicoré	Carapanatuba	Porto Velho	Guajará-Mirim	Cautário	
Ppu1	238 (0.067)	204 (0.033)	194 (0.025) 228 (0.025) 240 (0.025)	226 (0.043)	—	6
Ppu2	258 (0.033)	—	286 (0.025)	—	—	2
Ppu4	—	—	—	318 (0.045)	320 (0.056)	2
Ppu5	230 (0.052) 232 (0.017)	—	—	250 (0.022)		3
Ppu7	—	—	—	—	—	0
Ppu8	—	—	—	—	—	0
Ppu11	—	—	—	330 (0.022)	—	1
Ppu12	—	—	—	257 (0.045)	—	1
Ppu13	—	233 (0.031)	235(0.025)	—	—	2
Ppu14	302 (0.036)	—	—	340 (0.022) 344 (0.022) 348 (0.022) 352 (0.022)	314 (0.056) 316 (0.056) 324 (0.056) 366 (0.167) 372 (0.056)	10
Total private alleles per locality	5	2	5	9	6	27
Total private alleles per sub-basin	12			15		

Allele number in base pair and relative frequency (in parentheses) are listed for each locus analyzed.

Table S6 Analysis of molecular variance (AMOVA) of 10 microsatellites loci for *Pseudoplatystoma punctifer*.

Source of variation	Microsatellites		
	Variation (%)	Fixation Indices	<i>P</i>
Among Sub-basins	0.31	F_{ST} 0.003	0.586
Among individuals within Sub-basins	12.97	F_{IS} 0.130	0.010
Within individuals	86.73	F_{IT} 0.132	0.005

Significant values, after BH procedure for correction of *P* values and FDR ($P < 0.05$) in bold

Table S7 Analysis of molecular variance (AMOVA) of COI sequences for *Pseudoplatystoma punctifer*.

Source of variation	COI		
	Variation (%)	Fixation Indices	<i>P</i>
Among sub-basins	39.12	Φ_{ST} 0.391	< 0.001
Within sub-basins	60.88		

Significant values, after BH procedure for correction of *P* values and FDR ($P < 0.05$) in bold