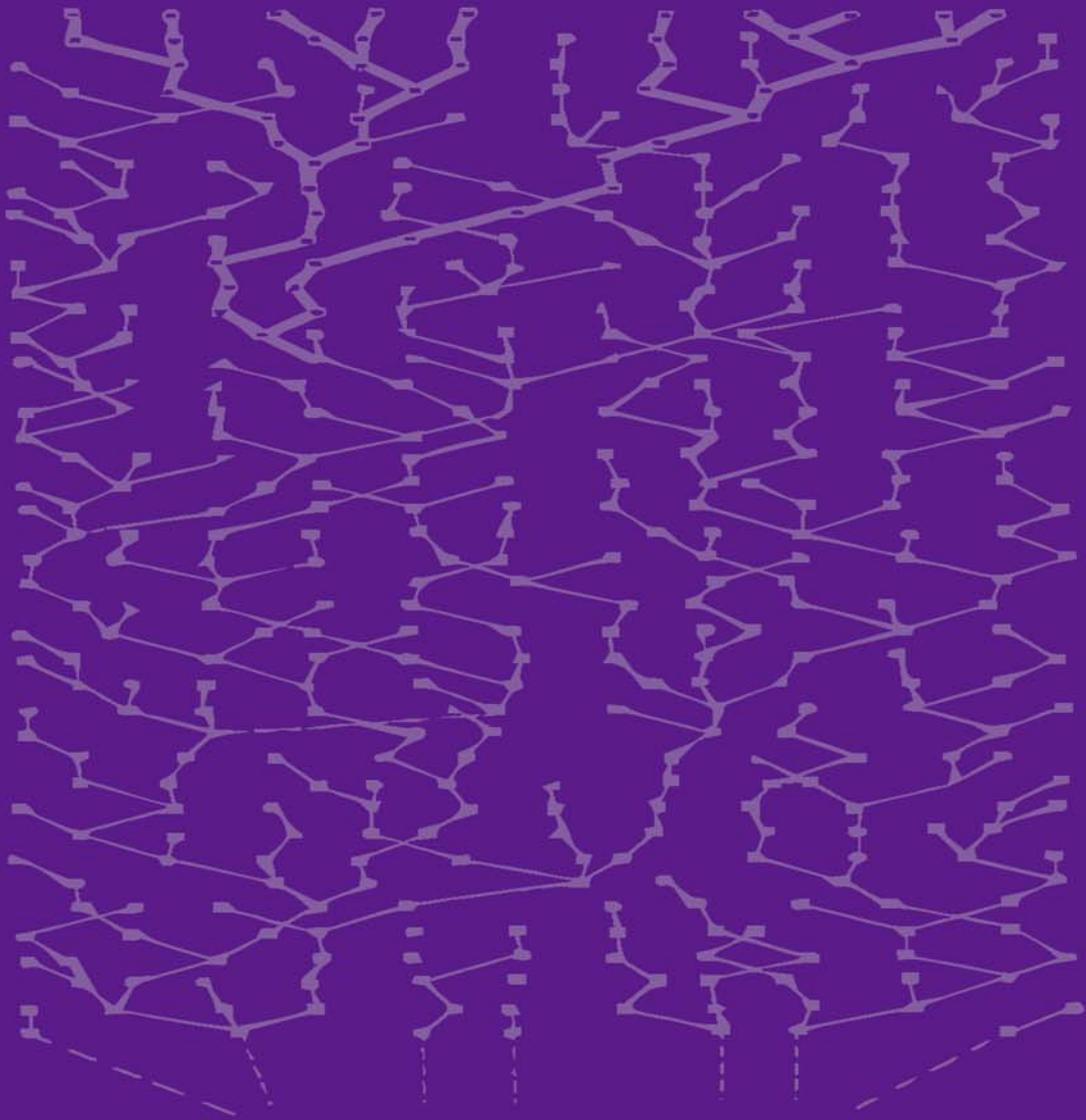


MUSEU DE ZOOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Especiação e biogeografia nos gêneros  
*Glandulocauda* Eigenmann e  
*Mimagoniates* Regan (Characidae:  
Stevardiinae: Glandulocaudini)**



**Priscila Camelier de Assis Cardoso**

São Paulo  
2016

MUSEU DE ZOOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMÁTICA, TAXONOMIA E  
BIODIVERSIDADE

**Especiação e biogeografia nos gêneros *Glandulocauda*  
Eigenmann e *Mimagoniates* Regan (Characidae:  
Stevardiinae: Glandulocaudini)**

**Priscila Camelier de Assis Cardoso**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Naércio Aquino Menezes**

Tese de Doutorado – Programa de Pós  
Graduação em Sistemática, Taxonomia  
Animal e Biodiversidade do Museu de  
Zoologia da Universidade de São Paulo.

São Paulo  
2016

### **Advertência**

Não autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico.

### **Notice**

I do not authorize the reproduction and dissemination of this work in part or entirely by any means electronic or conventional.

Cardoso, Priscila Camelier de Assis

Especiação e biogeografia nos gêneros *Glandulocauda* Eigenmann e *Mimagoniates* Regan (Characidae: Stevardiinae: Glandulocaudini) / Priscila Camelier de Assis Cardoso; orientador Naércio Aquino Menezes. – São Paulo, SP: 2016.

244 p.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Taxonomia e Biodiversidade, Museu de Zoologia da USP, 2016.

1. Characidae – Filogeografia – Mata Atlântica. 2. Characidae - Especiação. I. Menezes, Naércio, orient. II. Título.

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Para a melhor mãe do mundo,  
com todo o meu Amor e minha saúde, que serão eternos.

## Agradecimentos

Foram quatro anos! Quatro inesquecíveis anos que certamente serviram como um divisor de águas em minha vida profissional e pessoal. Foram anos de mudanças importantes, que vão além de ter saído da Bahia ou de perto da minha família pela primeira vez. Nestes quatro anos de doutorado, aprendi (e ainda estou aprendendo) muito e, hoje, ao olhar para o todo o processo, só resta-me agradecer. E agradecer muito! Ao longo deste tempo, muitas pessoas foram de fundamental importância para que eu pudesse escrever estas linhas e eu espero conseguir expressar, pelo menos em parte, a minha gratidão por elas.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Prof. Naércio, por...simplesmente TUDO! Pelo apoio, incentivo, paciência, disposição, ânimo, por **todo** o conhecimento compartilhado, mas, acima de tudo, sou extremamente grata por ele ter confiado a mim a responsabilidade de dar continuidade ao seu trabalho com os glandulocaudíneos. Esta confiança serviu de incentivo constante a cada dia destes quatro anos. A Naércio, também sou muito grata por ele ter sido um mestre, no sentido mais verdadeiro da palavra. Que honra a minha de ter sido sua aluna! Que honra...

Agradeço imensamente ao prof. Claudio Oliveira por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e por ter permitido, apoiado e incentivado o desenvolvimento deste trabalho, que eu não conseguiria ter desenvolvido sem o apoio de Guilherme. O “Varvito” teve toda a paciência do mundo em me ensinar absolutamente tudo sobre o mundo das moléculas, mesmo eu dizendo que “nem sabia o que era um nucleotídeo” e que “eu queria voltar para lupa”. Obrigada, Gui, por ter me apresentado este mundo de um jeito que me fizesse querer investir e crescer nele e, certamente, este doutorado é também fruto dos seus ensinamentos. Neste sentido, também agradeço imensamente a prof. Henrique Batalha-Filho, que não mediu esforços em me ensinar algumas análises e nem em discutir meus dados todas as vezes que bati à porta do seu laboratório.

Agradeço à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos os curadores e funcionários das instituições que me receberam ou que me enviaram material para análise: Artur Preto (NUPA), Angela Zanata (UFBA), Carla Pavanelli (Nupélia), Carlos Lucena (MCP), Claudio Oliveira (LBP), José Birindelli (MZUEL), Luiz Malabarba (UFRGS), Marcelo Britto e Cristiano Moreira (MNRJ), Ricardo Castro (LIRP). Agradeço também a todos os amigos queridos e familiares que me auxiliaram nas coletas de material biológico e à administração da Estação Biológica de Boraceia e do Parque das Neblinas por apoiarem as coletas realizadas nos seus domínios.

Ao Museu de Zoologia da USP pela infraestrutura e apoio dado ao desenvolvimento deste trabalho. Agradeço especialmente a todos os funcionários desta casa e, aqui, citarei três nomes, Marta, Célia e Dione: sem o apoio da secretaria, café e os livros, eu não teria nem começado o doutorado, quem dirá terminado!

Sou imensamente grata à Seção de Peixes do MZUSP, a todos os funcionários, professores, colegas, amigos e “BBFs”. Desde que comecei “a nadar” na ictiologia, sonho em estar aqui e como foi enriquecedor viver este sonho ao lado de cada um de vocês: Aléssio, D. Vera, Fer, Gustavito, Henrique, Igor, Ilana, João, Lu, Manuzinha, Marina, Mário de Pinna, Murilo, Tulinho, Veronica, Victor, Vinicius, William. Agradeço, especialmente, ao prof.

Heraldo Britski por ser uma fonte de inspiração e por todo conhecimento e ideias compartilhadas. Também sou especialmente grata a Fer, Manu, Ila, Lu, Henrique, Tulinho e Gustavito por todo o apoio dado na “tão temida e estressante” reta final, seja com fotos, mapas, cafés, cervejas, “bolos de banana e fubá”, convites para cozinhar...obrigada, MESMO! Agradeço muito ao nosso querido Michel, por ser esta companhia de trabalho (e de vida!) tão incrível, pelo profissional competente que ele é e por fazer as coisas darem certo na coleção, quando todos nós estamos estressados. Como não poderia deixar de ser, agradeço, agradeço muito, com todo meu carinho e admiração a Osvaldinho... o japonês que mais amo neste mundo! Por tudo! Por ter ido atrás dos meus bichos comigo em todos os quatro cantos deste Brasil, por me incentivar a ler os trabalhos de Ab’Saber e a entender mais sobre o litoral de São Paulo, sobre o Alto Tietê, Ribeira, o Paraíba do Sul...ah! Eu já mencionei Ab’Saber? Obrigada, Japa! Por cada ida à minha mesa e por cada coisa que me ensinou nestes quatro anos!

Aos meus amigos “não-peixólogos” do MZUSP por compartilharem ideias, momentos, conceitos, cafés e cervejas comigo! Certamente vocês tornaram estes quatro anos mais engrandecedores. Um agradecimento especial a Aline, Dani, Jujuba e Laura por tornarem as quartas-feiras os dias mais incríveis da semana!!! A Laurinha também agradeço o apoio com algumas figuras desta tese. Também fizeram toda diferença nesta reta final, Livia Fusari (amada!!!!), Rafa (que fasesss!) e Sérgio (Padre). Obrigada mesmo! Vocês todos são incríveis!

Agradeço a todos os alunos e funcionários do LBP, pela convivência, incentivo e apoio durante todas as minhas visitas a Botucatu para desenvolver as análises moleculares desta tese. Um agradecimento especial a Vivi, Rick e Rachel por sempre terem me recebido tão bem em suas casas nestes períodos.

Agradeço a Luly, Angelita e Fer por terem tornado "a volta para casa" um dos momentos mais esperados do dia ao longo do começo, meio e fim deste processo. A Luly, minha room, agradeço também por ser o melhor ponto de apoio e fonte de alegria que alguém pode ter; à "Sêra" por ser uma das pessoas que mais acredita em mim e por nunca ter deixado de ser minha mestra na vida profissional e pessoal; à Fer, por todo o apoio, carinho e paciência, cruciais nesta reta final.

Aos meus amigos da Bahia, amigos de vida! Agradeço por terem sido meu porto seguro quando tudo pareceu confuso e louco por aqui. Um obrigada especial a El, Marquinhos, Moniqueta, Mi, Gabi e Jonas.

Agradeço a Adolfo, por tudo de incrível que ele me ensinou e ensina e pela pessoa (e profissional) melhor que ele me faz ser. Por ele ter apoiado minha vinda para São Paulo, por ter me incentivado sem todos os momentos e por ter me feito acreditar que tudo daria certo, sempre!

Por fim, mas não por ser o menos importante, mas por ser a base de tudo isto, agradeço à minha família! A melhor e mais incrível de todas! Aos meus irmãos Ninha, Fabi, Nenê e Pêi (e PJ) pelo apoio e amor incondicionais! Por me mostrarem o tempo inteiro que eu NUNCA estarei sozinha, mesmo estando a milhares de quilômetros de distância, por investirem nos meus sonhos e planos de vida com a garra e amor, que só os irmãos de alma conhecem!! Vocês não existem!!! Ao meu pai, Pedro, meu maior exemplo de ser humano, por me apresentar o mundo com os olhos do vencedor que ele é e por me apoiar sempre e incondicionalmente, mesmo odiando a distância física que nos separa. E, finalmente, sou e sempre serei grata à minha mãe, Idália, minha maior e melhor fonte de aprendizado e inspiração...por toda a vida!

## Resumo

A tribo Glandulocaudini inclui os gêneros *Lophiobrycon*, *Glandulocauda* e *Mimagoniates* e dez espécies, distribuídas em ambientes de água doce do leste e sul do Brasil, no Paraguai e nordeste do Uruguai. São peixes neotropicais de pequeno porte, cujo grau de especialização morfológica e comportamental, bem como os padrões de distribuição das espécies, constituem interessante modelo para estudos evolutivos e para o entendimento de padrões biogeográficos de peixes de água doce na América do Sul. Embora os trabalhos sobre sistemática e biogeografia realizados recentemente representem avanço considerável no conhecimento de Glandulocaudini, nenhum foi embasado fundamentalmente em evidências moleculares. Além disso, amostragens recentes revelaram aspectos inéditos relativos à distribuição de populações alopátricas das espécies *Glandulocauda melanopleura* e *Mimagoniates microlepis* e estes novos dados indicaram a necessidade de estudos mais aprofundados em nível populacional, envolvendo a análise combinada de dados moleculares e morfológicos. A presente tese aborda estas questões, e para isto está dividida em três capítulos. No primeiro capítulo foi realizada uma análise filogenética com base em sequências gênicas do mtDNA e nuDNA para a tribo Glandulocaudini, que representa a primeira hipótese de relações proposta com base em dados moleculares para o grupo. No segundo e o terceiro capítulos foram realizadas análises filogenéticas, filogeográficas, de demografia histórica, e análises morfológicas das populações alopátricas de *Mimagoniates microlepis* e *Glandulocauda melanopleura*, respectivamente.

## Abstract

Speciation and biogeography in the genera *Glandulocauda* Eigenmann and *Mimagoniates* Regan (Characidae: Stevardiinae: Glandulocaudini). The tribe Glandulocaudini comprises three genera, *Lophiobrycon*, *Glandulocauda* and *Mimagoniates*, and ten species, distributed in freshwater environments of eastern and southern Brazil, Paraguay, and northeastern Uruguay. Its members include small Neotropical fishes, whose degree of morphological and behavioral specialization, as well as the distributional patterns of the species are of great value for evolutionary studies and understanding of biogeographical patterns of South American freshwater fishes. Although studies on systematics and biogeography carried out recently represent considerable progress on the knowledge of Glandulocaudini, none was grounded in molecular evidence. Furthermore, recent samples revealed unknown aspects concerning the allopatric distributions of populations of *Glandulocauda melanopleura* and *Mimagoniates microlepis*, and this new data indicates the need of more deep studies at population levels, combining both molecular and morphological analysis. This thesis addresses such issues and for this purpose it is divided in three chapters. In the first chapter, a phylogenetic analysis of the tribe Glandulocaudini, based on mtDNA and nuDNA data was performed, representing the first hypothesis of relationship for the group based on molecular data. In the second and third chapters, analysis of phylogeny, phylogeography and historical demography were performed, as well as morphological studies on allopatric population of *Mimagoniates microlepis* and *Glandulocauda melanopleura*, respectively.

## Lista de figuras e tabelas

### Capítulo 1

- Figura 1.** Colorido em vida de alguns representantes de Glandulocaudini. (A) *Lophiobrycon weitzmani*, LIRP 4338, parátipo, macho, 31,1 mm CP. Fonte: Castro *et al.* (2003); (B) *Glandulocauda melanopleura*, MZUSP 115244, macho, 40 mm CP. Foto: F. P. Dagosta; (C) *Mimagoniates microlepis*, MZUSP 112829, macho, 27,3 mm CP. Foto: O. T. Oyakawa; e (D) *Mimagoniates sylvicola*, MZUSP 112691, macho, 34 mm CP. Foto: O. T. Oyakawa.....4
- Figura 2.** Distribuição das espécies de Glandulocaudini no Sudeste da América do Sul; áreas mais baixas, em região de planície, são representadas em verde e a área representada em marrom corresponde ao escudo cristalino brasileiro, de altitude mais elevada. Figura modificada de Menezes *et al.* (2008: Fig. 3, página 39).....6
- Figura 3.** Hipótese de relações entre os gêneros e espécies de Glandulocaudini (na época, Glandulocaudinae), em destaque, proposta com base em dados morfológicos por Menezes & Weitzman (2009: Fig. 2, página 299).....7
- Figura 4.** Hipóteses entre os gêneros e espécies de Glandulocaudini propostas com base em dados moleculares nos trabalhos de (A) Oliveira *et al.* (2011) relativo à família Characidae e (B) Thomaz *et al.* (2015), abordando a subfamília Stevardiinae. Modificado de Oliveira *et al.* (2011: Fig. 12, página 16) e Thomaz *et al.* (2015: Fig. 5, página 10).....8
- Tabela 1.** Sequências de *primers* utilizados no presente estudo.....11
- Tabela 2.** Informações sobre as matrizes de dados geradas no presente estudo.....17
- Figura 5.** Topologia sumarizada, obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados concatenados (16S + COI + RAG2, 1829 pb) mostrando as hipóteses de relação entre Glandulocaudini (em destaque) e grupo externo. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior.....18
- Figura 6.** Topologia sumarizada, obtida através da análise de Máxima Verossimilhança da matriz de dados concatenados (16S + COI + RAG2, 1829 pb) mostrando as hipóteses de relação entre Glandulocaudini (em destaque) e grupo externo. Os números nos nós indicam os valores de *bootstrap* (%). “Clado B” refere-se ao agrupamento (*Charax* (*Cheirodon*, *Spintherobolus*)).....19
- Figura 7.** Parte da topologia obtida no presente estudo através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados concatenados (16S + COI + RAG2, 1829 pb), destacando as relações internas em Glandulocaudini. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente.....20
- Figura 8.** Topologia calibrada a partir da análise de relógio molecular, indicando as estimativas de datas dos eventos cladogenéticos ocorridos em Glandulocaudini (em destaque). As barras nos nós representam 95% de HPD (*High Posterior Density*) dos tempos de divergência. O eixo X representa milhões de anos (m.a.).....21
- Figura 9.** Mapa de distribuição dos gêneros e espécies de Glandulocaudini analisados no presente estudo. O X representa *Lophiobrycon weitzmani*; os triângulos o gênero *Glandulocauda*, *G. melanopleura* em preto e *G. caerulea* em azul; os círculos indicam as espécies de *Mimagoniates*, no sentido norte-sul: *M. sylvicola* (branco), *M. microlepis* (amarelo), *M. lateralis* (vermelho), *M. rheocharis* (roxo) e *M. inequalis* (marrom). Este mapa está atualizado em relação ao apresentado por Menezes *et al.* (2008), com base em informações disponibilizadas por Menezes & Weitzman (2009) e obtidas no presente estudo.....34
- Apêndice A - Tabela 1.** Lista das espécies de Glandulocaudini utilizadas no presente estudo, com seus respectivos números de *vouchers* e tecido, além da localidade. Em relação aos *vouchers*/tecido, o mesmo tombo indica que o espécime foi depositado inteiro na coleção de tecido.....46

### Capítulo 2

- Tabela 2.** Informações sobre as matrizes de dados geradas no presente estudo.....64
- Figura 1.** Topologia sumarizada, obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb), mostrando as hipóteses de relação entre *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, com destaque para os quatro haplogrupos propostos no presente estudo. Os

números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente e o (-) indica que o clado não foi recuperado por meio da análise de Máxima Verossimilhança.....65

**Figura 2.** Mapa de distribuição dos quatro haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* propostos no presente estudo. As siglas BA, ES, RJ, SP, PR, SC e RS se referem, respectivamente, aos seguintes estados brasileiros: Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A estrela (HAP2) representa a localidade tipo da espécie.....66

**Figura 3.** Topologia obtida através da análise de Inferência da matriz do gene nuclear RAG2 (770 pb), mostrando as hipóteses de relação entre *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, com destaque para os quatro haplogrupos propostos no presente estudo com base no mtDNA. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente e o (-) indica que o clado não foi recuperado por meio da análise de Máxima Verossimilhança.....68

**Figura 4.** (A) Árvore de espécies reconstruída por meio da análise combinada das matrizes mitocondrial (concatenada, 16S + COI) e nuclear (RAG2) (238 indivíduos), indicando as relações entre os quatro haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* propostos no presente estudo e entre estes e *Mimagoniates lateralis*; os números indicam o valor de probabilidade posterior de cada nó. (B) *Cloudgram* gerado a partir da sobreposição de todas as 18 mil árvores retidas após o *burn-in*; as linhas em azul representam as topologias mais comuns, seguidas das em vermelho e verde, e a linha azul mais escura representa a árvore de espécies com maior probabilidade posterior.....70

**Figura 5.** (A) Árvore ultramétrica, obtida através do método bayesiano da matriz de dados do gene COI (presente estudo + Thomaz *et al.*, 2015) e utilizada para análise de GMYC, com destaque para os haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* propostos. (B) Árvore ultramétrica apresentada em detalhe para *M. microlepis*; o asterisco indica probabilidade posterior >0,95. A linha vermelha representa a fronteira entre divergência inter e intraespecífica; a largura da base dos triângulos é diretamente proporcional ao número de amostras de cada espécie/haplogrupo.....72

**Tabela 2.** Valores de divergência genética (%) entre as seis unidades de *Mimagoniates microlepis* (255 exs.) estabelecidas através da análise de GMYC, *M. inequalis* (3 exs.), *M. lateralis* (17 exs.), *M. rheocharis* (21 exs.), *M. sylvicola* (35 exs.), *Glandulocauda caerulea* (4 exs.), *G. melanopleura* (20 exs.) e *Lophobrycon weitzmani* (3 exs.). Resultados obtidos através do modelo Kimura-2 parâmetros e com base na matriz de dados do COI (524 pb).....73

**Tabela 3.** Valores de divergência genética (%) entre os quatro haplogrupos de *Mimagoniates microlepis*, baseados no modelo Kimura-2 parâmetros e na matriz de dados do COI (524 pb).....74

**Tabela 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) de *Mimagoniates microlepis*, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). GL: grau de liberdade; p=0,00000.....75

**Figura 6.** Rede de haplótipos inferida a partir de 524 pb do gene mitocondrial COI de 255 indivíduos de *Mimagoniates microlepis* e 13 de *M. lateralis*. Cada haplótipo é representado por um círculo e seu tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos/haplogrupos e nelas estão indicados os passos mutacionais que o diferem. As cores representam os haplogrupos de *M. microlepis* e a espécie *M. lateralis*, conforme indicado na legenda. Os círculos em verde representam os vetores medianos (i.e., mutações adicionais).....75

**Tabela 5.** Estatísticas sumárias e valores dos testes de neutralidade de D e F<sub>s</sub> e do teste de mudança no tamanho populacional R<sub>2</sub> do gene mitocondrial COI (524pb) de *Mimagoniates microlepis*. N: tamanho amostral; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; dp: desvio padrão; π: diversidade nucleotídica por sítio; ns: não significativo; \*p=0,000000.....76

**Figura 7.** Estimativas da análise de *Bayesian Skyline Plot* (BSP) para os haplogrupos de *Mimagoniates microlepis*. A) Haplogrupo 2; B) Haplogrupo 3; C) Haplogrupo 1; D) Haplogrupo 4. A linha do meio representa a mediana da estimativa e as linhas superior e inferior de 95% de HPD (*Highest Posterior Density*), respectivamente. O eixo Y está em escala logarítmica. O eixo X representa milhões de anos (m.a.).....77

**Figura 8.** Parte da topologia obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb) de *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, destacando o Haplogrupo 1. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente. Os haplótipos (H) correspondentes do gene COI (524 pb) também são indicados para cada indivíduo/grupo.....78

**Figura 8.** Distribuição do Haplogrupo 1 de *Mimagoniates microlepis* em bacias costeiras da Bahia e Espírito Santo e rede de haplótipos deste haplogrupo, inferida a partir de 524 pb do gene mitocondrial

COI. Na rede, cada haplótipo é representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e o valor indicado nestas linhas corresponde ao número de mutações entre eles. As cores dos símbolos do mapa e dos círculos das redes são correspondentes.....79

**Tabela 6.** Estatísticas sumárias de cada localidade do HAP1, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). N: tamanho da amostra; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica por sítio; dp: desvio padrão. ....79

**Tabela 7.** Análise de variância molecular (AMOVA) do HAP1, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). GL: grau de liberdade; p=0,00000.....80

**Figura 10.** Parte da topologia obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb) de *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, destacando o Haplogrupo 2. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente. Os haplótipos (H) correspondentes do gene COI (524 pb) também são indicados para cada indivíduo/grupo.....82

**Figura 11.** Distribuição do Haplogrupo 2 de *Mimagoniates microlepis* em bacias costeiras do Rio de Janeiro (inclui localidade tipo) e São Paulo e rede de haplótipos deste haplogrupo, inferida a partir de 524 pb do gene mitocondrial COI. Na rede, cada haplótipo é representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e o valor indicado nestas linhas corresponde ao número de mutações entre eles. No mapa, a estrela representa a localidade tipo de *M. microlepis*, na bacia do rio Macacu, em Cachoeiras de Macacu, RJ.....84

**Tabela 8.** Análise de variância molecular (AMOVA) do HAP2, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). Para a AMOVA 1, foram consideradas como populações o ‘filogrupo norte’ e ‘filogrupo sul’, obtidos a partir da rede de haplótipos; já na AMOVA 2, foram consideradas as 19 localidades distintas. GL: grau de liberdade; p=0,00000.....85

**Tabela 9.** Estatísticas sumárias de cada localidade do HAP2, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). N: tamanho da amostra; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica por sítio; dp: desvio padrão.....85

**Figura 12.** Gráfico indicando os valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) por localidade amostrada para o Haplogrupo 2 de *Mimagoniates microlepis*.....86

**Figura 13.** Parte da topologia obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb) de *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, destacando o Haplogrupo 3. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente. Os haplótipos (H) correspondentes do gene COI (524 pb) também são indicados para cada indivíduo/grupo.....88

**Figura 14.** Distribuição do Haplogrupo 3 de *Mimagoniates microlepis* nas bacias do rio Alto Tietê (SP), Ribeira de Iguape (SP e PR) e em bacias costeiras do Paraná e rede de haplótipos deste haplogrupo, inferida a partir de 524 pb do gene mitocondrial COI. Na rede, cada haplótipo é representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e o valor indicado nestas linhas corresponde ao número de mutações entre eles. O HAP3\_norte e HAP3\_sul estão ligados por um vetor mediano (*median vector*, mv).....89

**Tabela 10.** Análises de variância molecular (AMOVA) do HAP3, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). Na AMOVA 1, foram consideradas como populações o ‘filogrupo norte’ e ‘filogrupo sul’, obtidos a partir da rede de haplótipos; na AMOVA 2, foram consideradas as localidades ‘Alto Tietê’ e ‘Costa;’ e já na AMOVA 3, foram consideradas 11 localidades distintas. GL: grau de liberdade; p=0,00000.....9

**Tabela 11.** Estatísticas sumárias de cada localidade do HAP3, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). N: tamanho da amostra; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica por sítio; dp: desvio padrão.....91

**Figura 15.** Gráfico indicando os valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) por localidade amostrada para o Haplogrupo 3 de *Mimagoniates microlepis*.....92

**Figura 16.** Parte da topologia obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb) de *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, destacando o Haplogrupo 4 e *M. lateralis*. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente. Os haplótipos (H) correspondentes do gene COI (524 pb)

também são indicados para cada indivíduo/grupo; haplótipos não indicados representam espécimes que não tiveram o gene 16S amplificado/sequenciado.....	94
<b>Figura 17.</b> Distribuição do Haplogrupo 4 de <i>Mimagoniates microlepis</i> nas bacias do rio Tibagi, Iguazu e em bacias costeiras de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e rede de haplótipos deste haplogrupo, inferida a partir de 524 pb do gene mitocondrial COI. Na rede, cada haplótipo é representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e o valor indicado nestas linhas corresponde ao número de mutações entre eles. O HAP4_norte e HAP4_sul estão ligados por um vetor mediano ( <i>median vector</i> , mv).....	96
<b>Tabela 12.</b> Análises de variância molecular (AMOVA) do HAP4, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). Na AMOVA 1, foram consideradas populações o ‘filogrupo norte’ e ‘filogrupo sul’, delineados a partir da rede de haplótipos; na AMOVA 2, foram consideradas apenas as localidades ‘Iguazu_Tibagi e ‘Costa’, e na AMOVA 3, foram consideradas considerou 14 localidades distintas. GL: grau de liberdade; p=0,00000.....	97
<b>Tabela 13.</b> Estatísticas sumárias de cada localidade do HAP4, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). N: tamanho da amostra; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; $\pi$ : diversidade nucleotídica por sítio; dp: desvio padrão.....	97
<b>Figura 18.</b> Gráfico indicando os valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) por localidade amostrada para o Haplogrupo 4 de <i>Mimagoniates microlepis</i> .....	98
<b>Tabela 14.</b> Dados morfométricos dos quatro haplogrupos de <i>Mimagoniates microlepis</i> propostos no presente estudo com base no mtDNA. N= número de espécimes examinados; DP = desvio padrão.....	100
<b>Tabela 15.</b> Dados merísticos de <i>Mimagoniates microlepis</i> , incluindo a amplitude de valores referentes a cada haplogrupo obtida no presente estudo, aquela apresentada por Menezes & Weitzman (2009) para o lectótipo, paralectótipos e topótipos** da espécie, além da variação total de dados. Contagens obtidas a partir de exemplares diafanizados e corados (d&c) são indicadas por *: HAP1, 3 exs.; HAP2, 3 exs.; HAP3, 2 exs.; e HAP4, 7 exs.....	101
<b>Figura 19.</b> Gráficos <i>BoxPlot</i> , indicando a variação de alguns caracteres merísticos entre os quatro haplogrupos de <i>Mimagoniates microlepis</i> propostos no presente estudo.....	102
<b>Figura 20.</b> Colorido em álcool de cada um dos haplogrupos de <i>Mimagoniates microlepis</i> , machos: (A) HAP1, MZUSP 93866, 35,4 mm CP (BA) e MZUSP 112829, 28,4 mm CP (ES). (B) HAP2, MZUSP 55290, 47,2 mm CP (Caraguatatuba) e MZUSP 114801, 41,6 mm CP (Peruíbe). (C) HAP3, MZUSP 115093, 28,6 mm CP (Alto Tietê) e MZUSP 62635, 48,3 mm CP (Ribeira de Iguape). (D) HAP4, MZUSP 40122, 44,2 mm CP (Iguazu) e MZUSP 72853, 36 mm CP (Maquiné). Fotos: F. P. Dagosta & P. Camelier.....	103
<b>Figura 21.</b> <i>Mimagoniates lateralis</i> , exemplar fixado, MZUSP 103970, macho, 25,6 mm CP, bacia do rio Itanhaém, São Paulo. Foto: P. Camelier.....	103
<b>Figura 22.</b> Colorido em vida de <i>Mimagoniates microlepis</i> , machos: (A) MZUSP 118711, 32 mm CP, topótipo (HAP2). (B) MZUSP 112829, 27,3 mm CP, HAP1 (ES). Fotos: J. C. Nolasco e O. T. Oyakawa.....	104
<b>Figura 23.</b> Descontinuidades filogeográficas propostas no presente estudo, com base na distribuição dos haplogrupos de <i>Mimagoniates microlepis</i> . Mapa modificado de Weitzman <i>et al.</i> (1988).....	122
<b>Apêndice A - Tabela 3.</b> Lista das espécies e espécimes de Glandulocaudini utilizadas nas análises moleculares e seus respectivos números de <i>vouchers</i> e tecido, localidades e marcadores sequenciados. Espécimes em negrito também tiveram o gene nuclear RAG2 sequenciado. Em relação a <i>Mimagoniates microlepis</i> , os indivíduos estão separados por haplogrupo, sendo apresentados no sentido norte-sul de distribuição. Para as abreviações institucionais, ver o item ‘Material & Métodos’.....	166

### Capítulo 3

<b>Tabela 4.</b> Informações sobre as matrizes de dados geradas no presente estudo.....	187
<b>Figura 9.</b> Topologia obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb), mostrando as hipóteses de relação entre as diferentes populações de <i>Glandulocauda melanopleura</i> e grupo externo. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e <i>bootstrap</i> (%) respectivamente e o (-) indica que o clado não foi recuperado por meio da análise de Máxima Verossimilhança.....	189
<b>Figura 10.</b> Topologia calibrada a partir da análise de relógio molecular baseada na matriz do gene COI (522 pb), indicando as estimativas de datas dos eventos cladogenéticos ocorridos em <i>Glandulocauda</i>	

<i>melanopleura</i> (em destaque). A letra “A” representa o clado (Alto Tietê, Itanhaém) e a letra “B” o clado (Guaratuba). As barras nos nós representam 95% de HPD ( <i>High Posterior Density</i> ) dos tempos de divergência. O eixo X representa milhões de anos (m.a.).....	190
<b>Tabela 2.</b> Valores de divergência genética (%) entre as três populações de <i>Glandulocauda melanopleura</i> (20 exs.) em destaque, <i>Lophiobrycon weitzmani</i> (3 exs.), <i>Glandulocauda caerulea</i> (4 exs.), <i>M. microlepis</i> (255 exs.), <i>M. sylvicola</i> (35 exs.), <i>M. rheocharis</i> (21 exs.), <i>M. inequalis</i> (3 exs.) e <i>M. lateralis</i> (17 exs.). Resultados baseados no modelo Kimura-2 parâmetros e na matriz de dados do COI (522 pb).....	191
<b>Figura 11.</b> (A) Árvore ultramétrica, obtida através do método bayesiano da matriz de dados do gene COI (presente estudo + Thomaz <i>et al.</i> , 2015a) e utilizada para análise de GMYC, com destaque para <i>Glandulocauda melanopleura</i> . (B) Árvore ultramétrica apresentada em detalhe para as populações de <i>G. melanopleura</i> ; o asterisco indica probabilidade posterior >0,95. A linha vermelha representa a fronteira entre divergência inter e intraespecífica.....	192
<b>Figura 12.</b> Mapa de distribuição e rede de haplótipos de <i>Glandulocauda melanopleura</i> , inferida a partir de 1059 pb da matriz concatenada dos genes mitocondriais 16S e COI. Na rede, cada haplótipo é representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e o valor indicado nelas corresponde ao número de passos mutacionais entre eles.....	194
<b>Tabela 3.</b> Análises de variância molecular (AMOVA) de <i>Glandulocauda melanopleura</i> , com base no gene mitocondrial COI (522 pb). Na AMOVA 1, as localidades Alto Tietê, Itanhaém e Guaratuba foram consideradas como populações distintas; na AMOVA 2 foram consideradas distintas as populações das localidades ‘Alto Tietê’ e ‘Costa’; e na AMOVA 3 as populações das localidades ‘Alto Tietê_Itanhaém’ e ‘Guaratuba’. GL: grau de liberdade; p<0,04.....	195
<b>Tabela 4.</b> Estatísticas sumárias e valores dos testes de neutralidade de D e F <sub>S</sub> e do teste de mudança no tamanho populacional R <sub>2</sub> relativas aos genes mitocondriais, 16S e COI, concatenados (1059 pb) de <i>Glandulocauda melanopleura</i> . N: tamanho amostral; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; dp: desvio padrão; π: diversidade nucleotídica por sítio; ns: não significativo. ‘TOTAL’ significa todas as populações juntas.....	195
<b>Tabela 5.</b> Dados morfométricos das populações de <i>Glandulocauda melanopleura</i> analisadas no presente estudo. O comprimento padrão está em mm e as demais medidas em %. N = número de espécimes examinados; DP = desvio padrão.....	197
<b>Tabela 6.</b> Dados merísticos de <i>Glandulocauda melanopleura</i> , incluindo a amplitude de valores referentes a cada população analisada no presente estudo, aquela apresentada por Menezes & Weitzman (2009) para o holótipo de <i>Hyphessobrycon melanopleurus</i> , <i>Glandulocauda melanogenys</i> e topótipos** da espécie, além da variação total de dados. Contagens obtidas a partir de exemplares diafanizados e corados (d&c) são indicadas por *: Alto Tietê, 2 exs.; Itanhaém, 2 exs.; Guaratuba, 2 exs.....	198
<b>Figura 13.</b> Gráficos <i>BoxPlot</i> , indicando a variação de alguns caracteres merísticos entre as populações de <i>Glandulocauda melanopleura</i> analisadas no presente estudo: ALT, Alto Tietê; GUA, Guaratuba; ITA, Itanhaém; NEB, Itatinga; e RIB, Ribeira de Iguape.....	199
<b>Figura 14.</b> Colorido em álcool de cada uma das populações de <i>Glandulocauda melanopleura</i> analisadas no presente estudo: (A) Alto Tietê, MZUSP 86967, macho, 58,4 mm CP; (B) Itanhaém, MZUSP 111017, macho, 50 mm CP; (C) Guaratuba, MZUSP 115244, macho, 39,4 mm CP; (D) Ribeira de Iguape, MZUSP 79429, macho, 48,9 mm CP; e (E) Itatinga, DZSJRP 6613, juvenil, 26,2 mm CP. Fotos: F. P. Dagosta.....	200
<b>Figura 15.</b> Colorido em vida de <i>Glandulocauda melanopleura</i> , MZUSP 115244 Guaratuba: (A) macho, 39,4 mm CP e (B) fêmea, 35 mm CP. Fotos: F. P. Dagosta.....	200
<b>Figura 16.</b> Variação no padrão de colorido da região humeral e opercular de <i>Glandulocauda melanopleura</i> da bacia do rio Itanhaém, MZUSP 111017 em machos (A e B, 55,8 mm CP e 44,5 mm CP, respectivamente) e fêmea (C, 42,1 mm CP).....	215
<b>Figura 17.</b> Gráficos <i>BoxPlot</i> , indicando a variação de alguns caracteres merísticos entre as populações de <i>Glandulocauda melanopleura</i> analisadas no presente estudo (ALT, Alto Tietê; GUA, Guaratuba; ITA, Itanhaém; NEB, Itatinga; e RIB, Ribeira de Iguape) e <i>Glandulocauda caerulea</i> .....	216

**Figura 18.** *Glandulocauda caerulea*, exemplar fixado, MZUSP 97663, macho, 40,8 mm CP, bacia do rio Iguaçú, Paraná. Foto: F. P. Dagosta.....217

**Anexos – Figura 1.** Cenário da captura fluvial do rio Guaratuba, no Estado de São Paulo. Imagem modificada de Oliveira (2003) e Oliveira (2010).....227

**Anexos – Figura 2.** Cenário proposto para a captura fluvial do rio Capivari (bacia do rio Itanhaém), no Estado de São Paulo. Imagem: mapa da bacia do rio Capivari, na APA Capivari-Mono, modificado de Jacintho (2003).....227

## SUMÁRIO

Capítulo 1 – Relações filogenéticas e história biogeográfica da tribo Glandulocaudini (Characiformes: Characidae: Stevardiinae) baseadas em dados moleculares.....	1
Resumo .....	2
1. Introdução .....	3
2. Material & Métodos.....	9
2.1. Amostragem taxonômica .....	9
2.2. Considerações sobre os genes utilizados .....	10
2.3. Extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento .....	11
2.4. Obtenção das sequências consenso, alinhamentos e matriz de dados .....	13
2.5. Análise de dados .....	14
2.5.1. Análise filogenética.....	14
2.5.2. Tempos de divergência.....	15
3. Resultados .....	16
3.1. Características das sequências e das matrizes de dados .....	16
3.2. Análises filogenéticas: hipóteses baseadas na matriz de dados concatenados .....	17
3.3. Tempos de divergência .....	20
4. Discussão .....	21
4.1. Filogenia molecular .....	21
4.1.1 Hipóteses filogenéticas baseadas em dados concatenados.....	21
4.1.2. Glandulocaudini Eigenmann <i>sensu</i> Menezes & Weitzman (2009) e Thomaz <i>et al.</i> (2015) como um grupo monofilético: análises diferentes, resultados semelhantes.....	22
4.1.3. Posição de Glandulocaudini em Stevardiinae <i>sensu</i> Thomaz <i>et al.</i> (2015).....	24
4.1.4. Relações entre os gêneros de Glandulocaudini: incongruências entre as hipóteses morfológicas e moleculares.....	25
4.1.5. O caso do gênero <i>Glandulocauda</i> : duas espécies não relacionadas.....	26
4.1.6. O gênero <i>Mimagoniates</i> e as relações de parentesco entre suas espécies.....	29
4.2. Biogeografia de Glandulocaudini: padrão de distribuição e tempos de divergência	31
5. Conclusões .....	36
6. Referências Bibliográficas .....	38
7. Apêndice.....	46

Capítulo 2 – Filogeografia e história demográfica de <i>Mimagoniates microlepis</i> (Steindachner) (Characidae: Stevardiinae: Glandulocaudini), peixe de água doce endêmico e amplamente distribuído em rios e riachos da Mata Atlântica, com comentários sobre a taxonomia e conservação da espécie.....	47
---	----

Resumo .....	48
1. Introdução.....	49
2. Material & Métodos .....	53
2.1. Análises moleculares .....	53
2.1.1. Amostragem taxonômica.....	53
2.1.2. Considerações sobre os genes utilizados.....	54
2.1.3. Extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento.....	55
2.1.4. Obtenção das sequências consenso, alinhamentos e matriz de dados.....	55
2.1.5. Análises filogenéticas .....	55
2.1.6. Árvore de espécies ( <i>Species Tree</i> ).....	57

2.1.7.	Análise de <i>Generalized Mixed Yule Coalescent</i> (GMYC) .....	58
2.1.8.	Análise de <i>DNA Barcoding</i> .....	59
2.1.9.	Análises filogeográficas.....	60
2.1.9.1.	Estimativas de estrutura filogeográfica.....	60
2.1.9.2.	Estatísticas sumárias e análises de demografia histórica .....	61
2.2.	Análises morfológicas .....	6
<b>3.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>63</b>
3.1.	Análises moleculares .....	63
3.1.1.	Características das sequências e das matrizes de dados.....	63
3.1.2.	Análise filogenética: hipóteses baseadas nos genes mitocondriais .....	64
3.1.3.	Análise filogenética: hipóteses baseadas no gene nuclear .....	67
3.1.4.	Árvore de espécies ( <i>Species Tree</i> ).....	69
3.1.5.	Análise de <i>Generalized Mixed Yule Coalescent</i> (GMYC) .....	71
3.1.6.	Análise de <i>DNA Barcoding</i> .....	73
3.1.7.	Análises filogeográficas.....	74
3.1.7.1.	Estrutura filogeográfica.....	74
3.1.7.2.	História demográfica .....	76
<b>HAPLOGRUPO 1</b>	.....	<b>76</b>
<b>HAPLOGRUPO 2</b>	.....	<b>81</b>
<b>HAPLOGRUPO 3</b>	.....	<b>87</b>
<b>HAPLOGRUPO 4</b>	.....	<b>92</b>
<b>4.</b>	<b>Análises morfológicas</b> .....	<b>99</b>
<b>5.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>104</b>
5.1.	Análises filogenéticas.....	104
5.1.1.	Árvores de genes: divergências entre marcadores mitocondrial e nuclear ..	104
5.1.2.	Árvore de espécies ( <i>Species Tree</i> ): combinação entre marcadores mitocondrial e nuclear.....	111
5.2.	Análises de GMYC e DNA barcoding: implicações na taxonomia e conservação de <i>Mimagoniates microlepis</i> filogenéticas .....	112
5.3.	Estrutura filogeográfica e demografia histórica de <i>Mimagoniates microlepis</i> .....	118
5.3.1.	Haplogrupo 1: considerações sobre distribuição, estrutura filogeográfica e história demográfica .....	126
5.3.2.	Haplogrupo 2: considerações sobre distribuição, estrutura filogeográfica e história demográfica .....	128
5.3.3.	Haplogrupo 3 considerações sobre distribuição, estrutura filogeográfica e história demográfica .....	132
5.3.4.	Haplogrupo 4: considerações sobre distribuição, estrutura filogeográfica e história demográfica .....	135
5.4.	Comparação entre os resultados do presente estudo e análise filogeográfica prévia realizada com <i>Mimagoniates microlepis</i> .....	139
5.5.	Análises morfológicas .....	141
<b>6.</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>142</b>
<b>7.</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>144</b>
<b>8.</b>	<b>Apêndice A</b> .....	<b>166</b>
<b>9.</b>	<b>Apêndice B</b> .....	<b>176</b>

<b>Capítulo 3 – Filogeografia, história demográfica e variação morfológica de <i>Glandulocauda melanopleura</i> (Ellis) (Characidae: Stevardiinae: Glandulocaudini), espécie endêmica de riachos que drenam a vertente atlântica da Serra do Mar, São Paulo</b> .....	<b>178</b>
---	------------

<b>Resumo .....</b>	<b>179</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>180</b>
<b>2. Material &amp; Métodos .....</b>	<b>182</b>
2.1. Análises moleculares .....	182
2.1.1. Amostragem taxonômica .....	182
2.1.2. Extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento.....	182
2.1.3. Obtenção das sequências consenso .....	183
2.1.4. Análises filogenéticas .....	183
2.1.5. Análise de <i>Generalized Mixed Yule Coalescent</i> (GMYC) e <i>DNA Barcoding</i> .....	184
2.1.6. Tempo de divergências .....	184
2.1.7. Análises filogeográficas .....	185
2.1.7.1. Estimativas de estrutura filogeográfica.....	185
2.1.7.2. Estatísticas sumárias e análises de demografia histórica .....	185
2.2. Análises morfológicas.....	186
<b>3. Resultados .....</b>	<b>186</b>
3.1. Análises moleculares. ....	186
3.1.1. Características das sequências e das matrizes de dados.....	186
3.1.2. Análise filogenética e tempo de divergência.....	187
3.1.3. Análises filogeográficas .....	193
3.1.3.1. Estrutura filogeográfica e história demográfica .....	193
<b>4. Análises morfológicas.....</b>	<b>196</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>201</b>
5.1. Variação morfológica em <i>Glandulocauda melanopleura</i> .....	212
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>217</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>218</b>
<b>8. Apêndice.....</b>	<b>226</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>227</b>

# **CAPÍTULO 1**



**Relações filogenéticas e história biogeográfica da tribo Glandulocaudini  
(Characiformes: Characidae: Stevardiinae) baseada em dados moleculares**

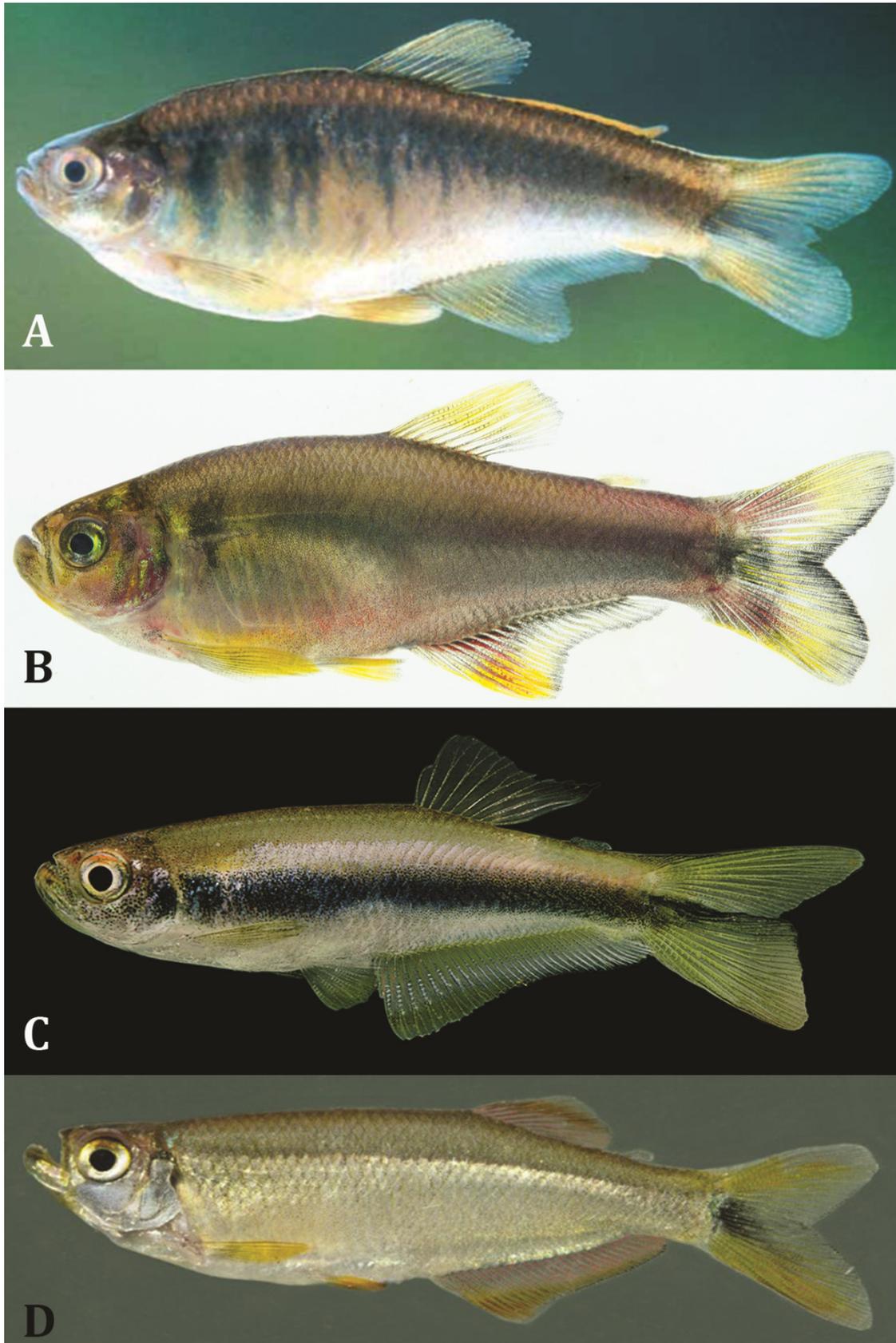
## Resumo

A tribo Glandulocaudini inclui três gêneros, *Lophiobrycon*, *Glandulocauda* e *Mimagoniates* e dez espécies distribuídas principalmente, em ambientes de água doce do leste e sul do Brasil, mas também no Paraguai e nordeste do Uruguai. Embora os trabalhos sobre sistemática e biogeografia realizados recentemente representem avanço considerável no conhecimento dos Glandulocaudini, nenhum foi embasado em evidências moleculares. Assim, no presente estudo, é apresentada a primeira hipótese filogenética proposta com base em dados de sequências gênicas para a tribo Glandulocaudini especificamente. Tal hipótese foi obtida através das análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de uma matriz de dados concatenados (1829 pb, mitocondrial, 16S rRNA e COI, e nuclear RAG2), contendo sequências de oito das dez espécies de Glandulocaudini, além do grupo externo. Sequências gênicas das espécies *Glandulocauda caerulea* e *Mimagoniates sylvicola* foram analisadas pela primeira vez. Os resultados obtidos indicaram que a tribo Glandulocaudini constitui um grupo monofilético, incluindo sua atual composição, conforme já proposto por análises prévias, realizadas com base em dados morfológicos e moleculares. Por outro lado, as relações entre as espécies da tribo não foram completamente concordantes com aquelas propostas através das análises morfológicas. O gênero *Glandulocauda* não é corroborado como monofilético, já que *G. melanopleura* é considerada grupo irmão de *L. weitzmani*, enquanto sua única congênere, *G. caerulea*, está mais relacionada às espécies de *Mimagoniates* analisadas. Estas, por sua vez formaram um clado, mas o monofiletismo de *Mimagoniates* não pôde ser testado, já que não foram analisadas sequências de *M. barberi*, espécie tipo do gênero. Em virtude de algumas incongruências entre as hipóteses morfológica e molecular, sugere-se aqui a realização de uma análise de evidência total, para uma melhor e mais completa compreensão da história evolutiva do grupo. No presente estudo, também foi realizada uma análise de relógio molecular e datações foram propostas pela primeira vez para os eventos cladogenéticos que influenciaram a configuração filogenética da tribo. Os resultados destas datações, aliados às informações geomorfológicas disponíveis, indicaram que a origem e diversificação de Glandulocaudini tiveram início em áreas altas do escudo cristalino brasileiro, provavelmente em uma paleodrenagem associada à atual bacia do rio Paraná, durante o Neógeno. A maioria das cladogêneses ocorreu neste período. A ocupação das áreas de planície teria se dado posteriormente, provavelmente como consequência dos eventos de capturas de cabeceiras ocorridos na região após processos sucessivos de reativações tectônicas do Terciário. Flutuações

do nível do mar, ocorridas no Pleistoceno, também tiveram papel no estabelecimento do atual padrão de distribuição das espécies do grupo, principalmente em nível populacional.

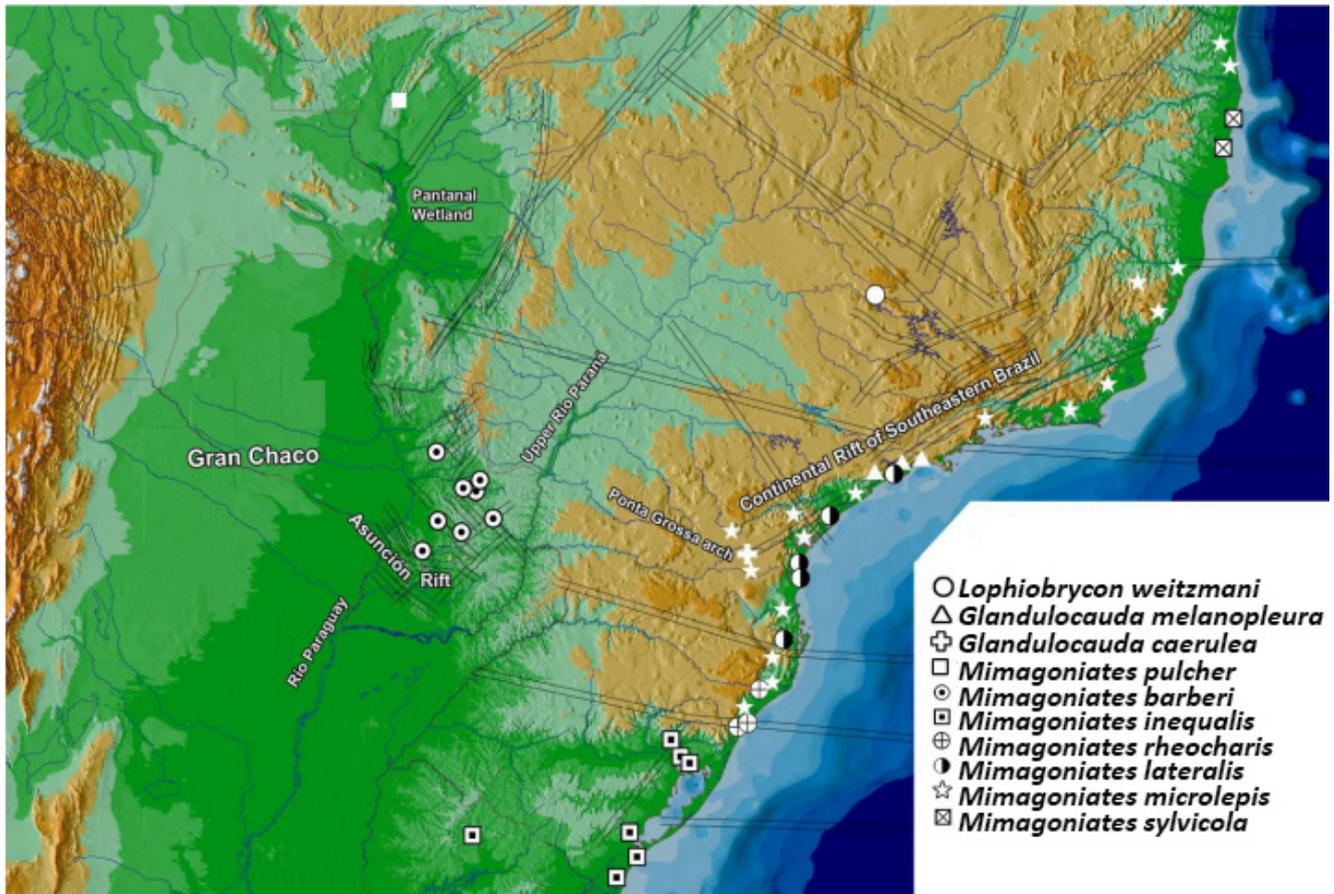
## 1. Introdução

O nome Glandulocaudinae foi proposto originalmente por Eigenmann (1914: 34) como uma subfamília dentro de Characidae para incluir onze gêneros com dimorfismo sexual bem acentuado. O histórico da composição e classificação hierárquica do grupo é extremamente complexo e confuso e, além de subfamília, Glandulocaudinae já foi considerada como família (Glandulocaudidae, *e.g.*, Fernandez-Yepez & Anton, 1966) e também como tribo (Glandulocaudini, *e.g.*, Myers & Böhlke, 1956). Menezes & Weitzman (2009) revisaram a sistemática de Glandulocaudinae e reconheceram o grupo como uma subfamília de Characidae relacionada a Stevardiinae. Neste trabalho, os autores apresentaram e discutiram de maneira pormenorizada o histórico taxonômico e as questões nomenclaturais envolvendo o grupo até aquele momento (ver Menezes & Weitzman, 2009: 302-304). Mais recentemente, Thomaz *et al.* (2015) fizeram uma análise de filogenia molecular de Stevardiinae e propuseram Glandulocaudinae *sensu* Menezes & Weitzman (2009) como uma tribo desta subfamília e, assim, o nome Glandulocaudini é o mais atual. Aqui é válido mencionar que, apesar de representarem categorias hierárquicas distintas, Glandulocaudinae *sensu* Menezes & Weitzman (2009) e Glandulocaudini *sensu* Thomaz *et al.* (2015) são equivalentes e correspondem a um grupo de pequenos peixes de água doce neotropicais que inclui os gêneros *Glandulocauda* Eigenmann, *Lophiobrycon* Castro, Ribeiro, Benine e Melo e *Mimagoniates* Regan, distribuídos em ambientes de água doce do leste e sul do Brasil, no Paraguai e nordeste do Uruguai (Menezes & Weitzman, 2009). Representa uma característica marcante dos glandulocaudíneos, a presença do que é considerada uma glândula produtora de feromônio na base da nadadeira caudal dos machos; a hipótese é que este feromônio seja liberado durante a época da reprodução para estimular a fêmea a se tornar receptiva à atividade de cortejamento do macho (Weitzman & Fink, 1985; Weitzman *et al.*, 1988; Menezes & Weitzman, 2009). Além disto, os representantes desta tribo são relativamente pequenos (tamanho entre 25-60 mm de comprimento padrão quando adultos), atrativamente coloridos (Fig. 1), aparentemente adaptados a habitats restritos e têm sua distribuição limitada em função da sua ecologia (Weitzman *et al.*, 1988; Menezes & Weitzman, 2009).



**Figura 1.** Colorido em vida de alguns representantes de Glandulocaudini. (A) *Lophibrycon weitzmani*, LIRP 4338, parátipo, macho, 31,1 mm CP. Fonte: Castro *et al.* (2003); (B) *Glandulocauda melanopleura*, MZUSP 115244, macho, 40 mm CP. Foto: F. P. Dagosta; (C) *Mimagoniates microlepis*, MZUSP 112829, macho, 27,3 mm CP. Foto: O. T. Oyakawa; e (D) *Mimagoniates sylvicola*, MZUSP 112691, macho, 34 mm CP. Foto: O. T. Oyakawa.

O gênero *Lophobrycon*, que compreende uma única espécie, *L. weitzmani* Castro, Ribeiro, Benine e Melo, foi descrito de riachos de cabeceira da bacia do rio Grande, sistema do alto rio Paraná, e está restrito à porção sudeste do escudo cristalino brasileiro. No gênero *Glandulocauda*, são incluídas duas espécies válidas: *G. caerulea* Menezes & Weitzman e *G. melanopleura* (Ellis). *Glandulocauda caerulea* foi descrita do alto rio Iguaçu (principal afluente da bacia do rio Paraná) e, até então, também é considerada endêmica da parte sudeste do escudo cristalino brasileiro, com distribuição restrita às regiões de elevadas altitudes do rio Iguaçu, nos Estados do Paraná e Santa Catarina (Ribeiro, 2006; Menezes *et al.*, 2008; Menezes & Weitzman, 2009). *Glandulocauda melanopleura* foi descrita com base em material coletado nas cabeceiras do rio Tietê (bacia do Paraná), em São Paulo, e tem distribuição registrada para áreas adjacentes à localidade tipo, em tributários do alto Tietê, e nas porções altas dos rios costeiros Guaratuba, Itatinga e Ribeira do Iguape (Ribeiro *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2007; Serra *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2008; Menezes & Weitzman, 2009). *Mimagoniates* é o gênero de Glandulocaudinae que tem o maior número de representantes: *M. barberi* Regan, *M. inequalis* (Eigenmann), *M. lateralis* (Nichols), *M. microlepis* (Steindachner), *M. pulcher* Menezes & Weitzman, *M. rheocharis* Menezes & Weitzman e *M. sylvicola* Menezes & Weitzman. Com exceção de *M. barberi* e *M. pulcher*, as demais espécies do gênero ocorrem em pequenos riachos que drenam, principalmente, a planície litorânea do leste do Brasil, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (Menezes & Weitzman, 2009). *Mimagoniates barberi*, espécie tipo do gênero, é conhecida de pequenos tributários do rio Paraguai e Paraná, próximo à Foz do Iguaçu, no Paraguai. *Mimagoniates pulcher* foi a espécie do gênero descrita mais recentemente (Menezes & Weitzman, 2009) e, até o momento, só é conhecida da localidade tipo, no alto rio Paraguai, Estado do Mato Grosso. Assim como *Glandulocauda* e *Lophobrycon*, a grande maioria das espécies de *Mimagoniates* tem distribuição relativamente restrita, com alto grau de endemismo reconhecido. O padrão de distribuição das espécies da tribo é apresentado na Fig. 2, abaixo, tendo como base as informações disponíveis até a realização do presente estudo.



**Figura 2.** Distribuição das espécies de Glandulocaudini no Sudeste da América do Sul; áreas mais baixas, em região de planície, são representadas em verde e a área representada em marrom corresponde ao escudo cristalino brasileiro, de altitude mais elevada. Figura modificada de Menezes *et al.* (2008: Fig. 3, página 39).

Conforme já mencionado anteriormente, a sistemática de Glandulocaudini era historicamente confusa e, apenas após a restrição do grupo às espécies de *Glandulocauda*, *Lophiobrycon* e *Mimagoniates*, foi possível discutir de forma mais clara as relações de parentesco entre as espécies (Menezes & Weitzman, 2009). O trabalho destes autores, que representa a hipótese filogenética mais recente proposta de Glandulocaudini, tal como reconhecida atualmente, incluiu todas as espécies do grupo e teve como base, principalmente, a análise de caracteres sexuais primários e secundários de machos adultos. De acordo com a hipótese de Menezes & Weitzman (2009), *Lophiobrycon* é grupo irmão de um clado mais derivado, formado por *Glandulocauda* e *Mimagoniates*, mas as relações entre as espécies deste último gênero não foram satisfatoriamente esclarecidas (Fig. 3).

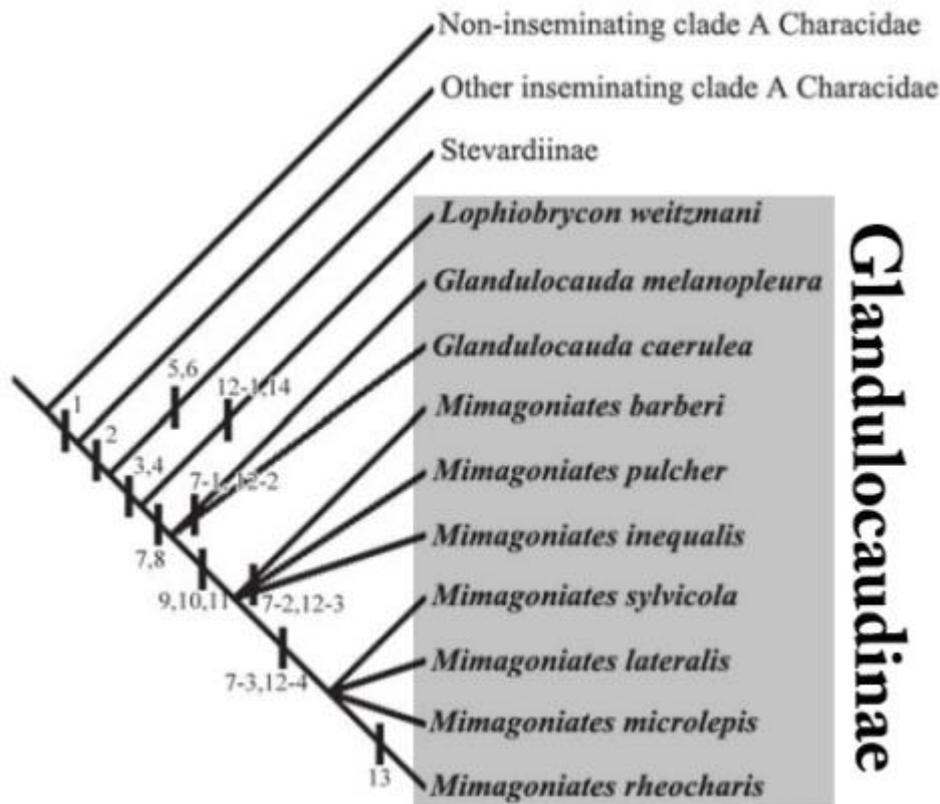
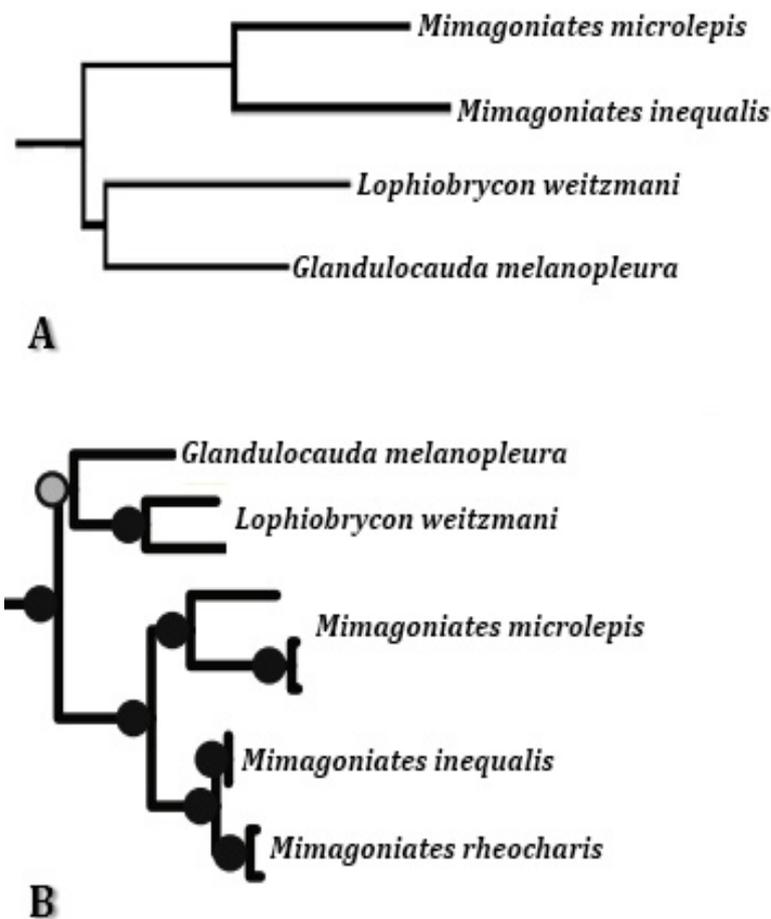


Figura 3. Hipótese de relações entre os gêneros e espécies de Glandulocaudini (na época, Glandulocaudinae), em destaque, proposta com base em dados morfológicos por Menezes & Weitzman (2009: Fig. 2, página 299).

Representantes de Glandulocaudini já foram incluídos em inúmeras análises filogenéticas baseadas em dados moleculares (*e.g.*, Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015), mas nenhuma delas teve como foco a tribo em si. Apenas nos trabalhos de Oliveira *et al.* (2011), relativo à família Characidae, e de Thomaz *et al.* (2015), abordando a subfamília Stevardiinae, foram incluídas sequências gênicas dos três gêneros da tribo (Fig. 4a e Fig. 4b, respectivamente), mas, em ambos, não mais do que 50% das espécies foi analisado. As hipóteses propostas por estes autores corroboram o monofiletismo de Glandulocaudini, proposto por Menezes & Weitzman (2009), mas discordam da hipótese deles em relação ao clado (*Glandulocauda*, *Mimagoniates*), visto que, em ambas as análises, o gênero *Glandulocauda* é proposto como grupo irmão de *Lophiobrycon*.



**Figura 4.** Hipóteses entre os gêneros e espécies de Glandulocaudini propostas com base em dados moleculares nos trabalhos de (A) Oliveira *et al.* (2011) relativo à família Characidae e (B) Thomaz *et al.* (2015), abordando a subfamília Stevardiinae. Modificado de Oliveira *et al.* (2011: Fig. 12, página 16) e Thomaz *et al.* (2015: Fig. 5, página 10).

De acordo com Ribeiro *et al.* (2016), Glandulocaudini talvez seja o grupo de peixes de água doce melhor estudado do ponto de vista biogeográfico. O último trabalho versando diretamente sobre a biogeografia do grupo foi o de Menezes *et al.* (2008). Neste artigo, entretanto, os autores salientaram a necessidade de estudos mais aprofundados, especialmente, com o uso de ferramentas moleculares, para uma melhor compreensão da origem e diversificação das espécies de Glandulocaudini, cujo padrão biogeográfico parece mais complexo do que se tinha conhecimento até aquele momento. Apesar de passados quase dez anos da publicação deste artigo e do padrão de distribuição do grupo ou de alguma das suas espécies ter sido discutido ou utilizado como exemplo em inúmeros estudos biogeográficos posteriores (*e.g.*, Buckup, 2011; Lima & Ribeiro, 2011; Camelier & Zanata, 2014; Ribeiro *et al.*, 2016), uma análise utilizando a abordagem sugerida por Menezes *et al.* (2008) ainda não foi realizada. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo principal realizar uma análise filogenética de Glandulocaudini, tendo como base dados moleculares e com a inclusão de todos os gêneros e maioria das espécies da tribo. Além disso, foi realizada uma análise de relógio

molecular para estimar tempos de divergências dentro do grupo que, aliados às informações sobre a distribuição das espécies e dados geomorfológicos disponíveis, possibilitaram uma discussão mais refinada sobre a biogeografia e história evolutiva da maioria das espécies de Glandulocaudini.

## 2. Material & Métodos

### 2.1. Amostragem taxonômica

O grupo interno inclui os três gêneros e oito das dez espécies de Glandulocaudini: *Lophiobrycon weitzmani*, *Glandulocauda caerulea*, *G. melanopleura*, *Mimagoniates inequalis*, *M. lateralis*, *M. microlepis*, *M. rheocharis* e *M. sylvicola*. A ausência de amostras de tecido em coleções e de sequências disponíveis no *GenBank* de *Mimagoniates barberi* e *M. pulcher* impossibilitaram a inclusão destas espécies na análise. Como apresentado na ‘Introdução’, Glandulocaudini é membro da subfamília Stevardiinae *sensu* Thomaz *et al.* (2015). Assim, o grupo externo é composto de representantes de todas as outras tribos definidas por estes autores (i.e., Creagrutini, Diapomini, Eretmobryconini, Hemibryconini, Stevardiini e Xenurobryconini), além da espécie *Argopleura chocoensis* (Eigenmann), considerada *incertae sedis* em Stevardiinae. Também foram incluídas no grupo externo, três espécies de Characidae não pertencentes a esta subfamília, *Charax stenopterus* (Cope), *Cheirodon ibicuiensis* Eigenmann e *Spintherobolus leptoura* Weitzman & Malabarba, além de *Bryconops caudomaculatus* (Günther). *Bryconops* Kner pertence a Characiformes, mas sua inclusão em Characidae é controversa pois, apesar de hipóteses filogenéticas baseadas em dados morfológicos (e.g., Mirande, 2010) indicarem que o gênero representa um dos caracídeos basais, segundo hipóteses baseadas em dados moleculares (e.g., Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015), o gênero não pertence a Characidae, e sim a Iguanodectidae, família proposta recentemente que inclui, além deste gênero, *Iguanodectes* Cope e *Piabucus* Oken (Oliveria *et al.*, 2011). Independente da família a que pertence, sequências de *B. caudomaculatus* foram utilizadas para o enraizamento das topologias, já que este é o táxon do presente conjunto de dados mais distante de Glandulocaudini. As sequências gênicas das espécies utilizadas como grupo externo foram obtidas no *GenBank* e correspondem àquelas disponibilizadas por Thomaz *et al.* (2015), com exceção das de *Spintherobolus leptoura*, depositadas por Oliveira *et al.* (2011). No caso do grupo interno, todas as sequências foram obtidas no presente estudo, com exceção das de *L. weitzmani*, que foram retiradas do *GenBank*, onde também foram

depositadas por Oliveira *et al.* (2011) e Thomaz *et al.* (2015). Aqui, no entanto, é importante ressaltar que todos os *vouchers* referentes às sequências do grupo interno, incluindo *L. weitzmani*, foram examinados e identificados em nível de espécie, tendo como base os caracteres morfológicos diagnósticos apresentados na literatura (*e.g.*, Eigenmann, 1911; Menezes & Weitzman, 1990, 2009; Castro *et al.*, 2003). Para a maioria das espécies, foram incluídas sequências de pelo menos dois indivíduos. No caso de *Mirmagoniates microlepis*, espécie mais amplamente distribuída de Glandulocaudini, um número maior de amostras foi incluído para que representantes das diferentes populações alopátricas fossem analisados. Parte do material analisado foi coletada durante o presente estudo, no período entre 2012 e 2015. Os *vouchers* das amostras das espécies de Glandulocaudini estão depositados nas coleções das seguintes instituições brasileiras: Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* de Botucatu, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ), Rio de Janeiro, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), São Paulo e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.

## 2.2. Considerações sobre os genes utilizados

O DNA mitocondrial (mtDNA), além de ser de grande utilidade em estudos de microevolução, como um marcador de análises em nível intraespecífico (ver Capítulo 2 desta tese), tem se mostrado extremamente informativo em análises filogenéticas de categorias mais inclusivas do reino animal (Avise, 2004). Do ponto de vista filogenético, entretanto, o mtDNA como um todo constituiu um único *locus*, uma vez que os estados de caráter estão ligados genealogicamente em virtude do modo assexuado de transmissão da molécula (Avise, 2000). Assim, a inclusão de genes nucleares em trabalhos de filogenia tem se mostrado uma abordagem interessante, já que estes marcadores fazem parte de outro conjunto de informações no genoma, possibilitando uma análise *multilocus* (*i.e.*, aquela que acessa informação de múltiplos *locus* ao mesmo tempo) (Avise, 2004). Além disso, os genes nucleares apresentam taxas evolutivas mais lentas em relação aos mitocondriais e, conseqüentemente, podem ser mais eficientes na recuperação das relações de grupos mais inclusivos (*e.g.*, famílias, tribos, ordens) (Slowinski & Page, 1999). De acordo com estes autores, portanto, uma análise filogenética ideal (baseada em dados moleculares) é aquela que reúne informações obtidas a partir do mtDNA e do DNA nuclear (nuDNA).

No presente estudo, foram utilizados dois genes mitocondriais, 16S rRNA e Citocromo Oxidase I (COI), e um nuclear, o Gene Ativador de Recombinação 2 (RAG2). No mtDNA, há

dois grupos de genes costumeiramente utilizados em estudos micro e macroevolutivos, genes codificadores de rRNA e de proteínas. O 16S rRNA faz parte da grande subunidade ribossomal do mtDNA, apresenta sequências razoavelmente conservadas e, apesar de evoluir mais devagar do que o genoma mitocondrial como um todo, apresenta variação considerável em alguns táxons, sendo bastante utilizado em reconstruções filogenéticas (Palumbi, 1996). O gene COI codifica uma proteína relacionada à cadeia transportadora de elétrons, sua sequência de aminoácido é muito conservada entre alguns grupos, o que torna o alinhamento fácil, além de permitir a construção de *primers* universais (Palumbi, 1996). Segundo alguns autores, o COI é o gene mitocondrial que melhor recupera sinais filogenéticos (Hebert *et al.*, 2003), sendo utilizado com frequência neste tipo de análise e nos mais variados níveis taxonômicos. Os genes Ativadores de Recombinação 1 e 2 (RAG1 e RAG2) são genes nucleares que estão adjacentes no genoma, presentes em todos os vertebrados com maxilas (Sullivan *et al.*, 2006). O RAG2 não apresenta íntrons (Willet *et al.*, 1997) e possui características úteis para análise filogenética molecular, tais como pequena taxa de evolução, composição de bases quase constante entre os táxons, pouca quantidade de *indels* (inserções/deleções), além de baixa taxa de saturação (Groth & Barrowclough, 1999). Tanto o RAG2, quanto o 16S e o COI têm sido costumeiramente utilizados em estudos de filogenia de peixes da ordem Characiformes, principalmente dentro da família Characidae (*e.g.*, Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011).

### 2.3. Extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento

Amostras de tecido muscular (na maioria dos casos), brânquias e nadadeiras, preservadas em etanol 96%, foram utilizadas como fonte de material genético. Para cada espécime, a extração do DNA total foi feita a partir de 20-30 mg de tecido utilizando os kits comerciais DNeasy Tissue Kit (Qiagen) e Purelink<sup>®</sup> Genomic DNA Kit (Invitrogen), seguindo as instruções dos fabricantes. Sequências parciais dos três genes, 16S rRNA, COI e RAG2, foram amplificadas utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (em inglês, *Polymerase Chain Reaction*, PCR), com os *primers* descritos na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1. Sequências de *primers* utilizados no presente estudo.

Gene	Primer	Sequência (5'–3')	Referência
16S rRNA	16Sa-L	ACGCCTGTTTATCAAAAACAT	Palumbi (1996)
	16Sb-H	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	
	FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	

COI	FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	Ward <i>et al.</i> (2005)
RAG2	1°PCR		
	164F	AGCTCAAGCTGCGYGCCAT	Oliveira <i>et al.</i> (2011)
	RAG2-R6	TGRTCCARGCAGAAAGTACTTG	Lovejoy & Collette (2001)
	2°PCR		
	176F	GYGCCATCTCATTCTCCAACA	Oliveira <i>et al.</i> (2011)
Rag2Ri	AGAACAAAAGATCATTGCTGGTCGGG	Oliveira <i>et al.</i> (2011)	

As amplificações dos genes mitocondriais foram feitas em um volume total de 12,5 µl para cada gene, contendo 1,25 µl de tampão 10X (10 mM Tris-HCl+15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,375 de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25 µl de dNTPs (200 nM de cada), 0,25 µl de cada *primer* (5 mM), 0,05 µl de Taq Platinum<sup>®</sup> Polymerase (Invitrogen), 9,075 µl de ddH<sub>2</sub>O e 1 µl de DNA total (12 ng). As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), de acordo com os seguintes passos: (1) desnaturação inicial a 95°C por 5 min; (2) 35 ciclos de amplificação, divididos nas etapas (a) desnaturação a 95°C por 45 s, (b) anelamento a 52°C para o 16S e 54°C para o COI por 30 s e (c) extensão a 72°C por 60 s; e (3) extensão final a 72°C por 7 min.

Para amplificar o gene nuclear, RAG2, foi utilizada a técnica de *Nested-PCR*. As duas amplificações foram feitas em um volume total de 1,25 µl de tampão 10X (10 mM Tris-HCl+15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,375 de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µl de dNTPs (200 nM de cada), 0,25 µl de cada *primer* (5 mM), 0,08 µl de Taq Platinum<sup>®</sup> Polymerase (Invitrogen), 8,795 µl de ddH<sub>2</sub>O e 1 µl de DNA total (12 ng) para o 1°PCR e 1 µl do produto do 1°PCR processado (i.e., diluído e purificado) para o 2°PCR. As condições de termociclagem para o RAG2 consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 3 min para os dois PCRs; seguida de 30 ciclos de amplificação, sendo os 15 primeiros divididos nas seguintes etapas: (1) desnaturação a 94°C por 45 s, (2) anelamento a 56°C para o 1°PCR e 58°C para o 2°PCR por 45 s e (3) extensão a 72°C por 2 min; e o 15 ciclos finais divididos nas etapas: (1) desnaturação a 94°C por 45 s, (2) anelamento a 54°C para o 1°PCR e 56°C para o 2°PCR por 45 s e (3) extensão a 72°C por 2 min; ambos PCRs foram finalizados com a etapa de extensão final a 72°C por 7 min.

Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%. Em cada um dos poços da placa de agarose, foram colocados 2 µl de DNA amplificado + 2 µl de DNA loading dye (i.e., tampão de corrida ou carregamento). Para identificar o tamanho aproximado das moléculas, os produtos amplificados foram comparados com o Ladder 1 kb plus. Os

resultados das ampliações considerados positivos foram purificados utilizando a ExoSap-IT<sup>®</sup> (USB Corporation), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o kit Big Dye<sup>™</sup> Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) em duas reações (para cada *primer*, *forward* e *reverse*) de volume total de 7 µl cada: 3,55 µl de ddH<sub>2</sub>O, 1,05 µl de tampão do Big Dye<sup>™</sup> Terminator, 0,7 µl de Big Dye<sup>™</sup> Terminator, 0,7 µl de *primer* F ou R (5 mM) e 1 µl do produto de PCR. A reação de PCR de sequenciamento foi conduzida no termociclador Veriti Thermal Cycler de acordo com os seguintes passos para todos os genes: (1) desnaturação inicial a 96°C por 2 min; (2) 30 ciclos, divididos nas etapas (a) desnaturação a 94°C por 30 s, (b) anelamento a 56°C por 60 s e (c) extensão a 72°C por 2 min; e (3) extensão final a 68°C por 4 min. Os produtos da reação de PCR de sequenciamento foram purificados utilizando EDTA (125 mM), acetato de sódio (3 M) e etanol 100%, de acordo com o protocolo apresentado no manual do kit de sequenciamento da Big Dye<sup>™</sup> Terminator. As sequências da maioria das amostras foram obtidas através de sequenciamento por capilaridade no sequenciador de DNA automático ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu. Uma parte das amostras foi sequenciada no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou da FIOCRUZ de Belo Horizonte, Minas Gerais.

#### **2.4. Obtenção das sequências consenso, alinhamentos e matriz de dados**

As sequências consenso de cada gene (i.e., *contigs*) foram montadas no programa Genious v. 4.8.5 (Biomatters Ltd.), a partir da visualização e checagem simultânea do eletroferograma originário do processo de sequenciamento automático. Após esta etapa, os *contigs* de cada indivíduo foram copiados em um editor de texto juntamente com as sequências obtidas no *GenBank*, nomeados separadamente e salvos em um arquivo único (por gene). As sequências consenso de cada gene foram alinhadas independentemente utilizando o Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (Edgar, 2004), sob os parâmetros do *default*. Todos os alinhamentos foram, então, analisados e checados através do programa BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall, 1999) para correção manual quando necessário. A correção manual incluiu basicamente a verificação de sequências invertidas e corte das extremidades. O alinhamento foi realizado nos três genes de forma independente e, posteriormente, os blocos de dados de cada gene, já alinhados, foram utilizados para a confecção da matriz de dados concatenados. Antes da concatenação, entretanto, foi realizada uma etapa de “controle de qualidade”, para detectar potenciais erros de sequenciamento devido, principalmente, à contaminação. Nesta etapa, foi feita uma reconstrução filogenética preliminar, com base no alinhamento de cada gene

individualmente e utilizando o método de Máxima Verossimilhança, implementado no programa MEGA v. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Sequências consideradas “fora do esperado” (*e.g.*, indivíduos de uma espécie agrupados em espécies/gêneros distintas/os, espécies congêneres não relacionadas) foram checadas novamente e, quando necessário, os processos de extração, amplificação e/ou sequenciamento foram repetidos. Uma vez que os alinhamentos individuais foram checados, estes foram somados para elaboração da matriz de dados concatenados no programa Genious. Nesta matriz, só foram incluídos indivíduos que tiveram todos os fragmentos dos marcadores de interesse amplificados e sequenciados. Todas as análises foram feitas com base na matriz de dados concatenados.

## 2.5. Análise de dados

A acurácia de uma reconstrução filogenética baseada em dados moleculares depende de fatores que incluem, não apenas a qualidade das sequências e do alinhamento, mas também o nível de saturação de substituição que, quando muito alto, reduz a informação filogenética contida nas sequências (Xia & Lemey, 2009). Para avaliar a ocorrência de saturação e conseqüentemente a qualidade dos dados, estimou-se, para cada gene separadamente, o Índice de Saturação de Substituição ( $I_{SS}$ ), como descrito por Xia *et al.* (2003) e Xia & Lemey (2009) no programa DAMBE v. 5.3.48 (Xia, 2013). A estimativa do  $I_{SS}$  foi realizada sem levar em consideração os *gaps*, uma vez que sítios não resolvidos reduzem a capacidade do método de testar o sinal filogenético dos dados (Xia, 2013; Roxo *et al.*, 2014). As matrizes de dados geradas (16S rRNA, COI, RAG2 e concatenada) também foram analisadas no MEGA v. 5.0 para obtenção do número de sítios conservados (C), variáveis (V) e informativos ( $P_i$ ). O melhor modelo de evolução nucleotídica para cada gene foi estimado no programa PartitionFinder (Lanfear *et al.*, 2012), sob o critério de informação de Akaike (AIC).

### 2.5.1. Análise filogenética

Para a reconstrução filogenética em Glandulocaudini, foram utilizados os métodos probabilísticos de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). A análise de MV foi feita através do programa RAxML-HPC2 v.8.2.4 (Stamatakis, 2014). O RAxML (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) foi desenvolvido para inferir, de forma eficiente, topologias (baseadas em MV) de conjuntos extremamente grandes de dados, seja em relação ao número de táxons e/ou tamanho das sequências e tem, como maiores vantagens, o método de busca eficiente e rápido, bem como pequeno consumo de memória computacional.

Árvores randômicas de partida foram geradas em cada busca independente e todos os outros parâmetros foram estabelecidos em valores padrão. Todas as análises de MV foram conduzidas sob o modelo GTRCAT e a robustez topológica foi investigada através do teste estatístico de *Bootstrap* com 1.000 pseudoréplicas. A IB foi realizada no programa MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012), sob o modelo GTR+G para cada partição (genes) conforme estimado através do PartitionFinder, partindo de uma árvore randômica das buscas da *Monte Carlo Markov chain* (MCMC). A análise em si consistiu em duas corridas simultâneas, com 20 milhões de gerações cada, sendo cada uma com quatro MCMC e uma árvore foi salva a cada 500 gerações. Foram excluídas as 4 mil árvores iniciais (i.e., *burn-in* de 10%) e os valores de probabilidade posterior foram estimados com as árvores restantes. Na versão do MrBayes utilizada no presente estudo, é possível checar, no próprio programa, o desempenho da MCMC e a convergência entre as corridas, através do *Effective Sample Size* (ESS) e *Potencial Scale Reduction Factor* (PSRF, Gelman & Rubin, 1992). Valores maiores que 200 e próximos a um no primeiro e segundo caso, respectivamente, indicam bom desempenho da análise. As análises filogenéticas foram implementadas no portal CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010). As topologias Bayesianas e de MV foram visualizadas e editadas através dos programas FigTree v. 1.3.1 (Rambaut, 2009) e MEGA.

### 2.5.2. Tempos de divergência

As estimativas de tempo de divergência entre os táxons de interesse foram obtidas a partir de datação molecular utilizando a análise de relógio molecular, implementada nos programas do pacote BEAST v. 1.8.0 (Drummond *et al.*, 2012). Para esta análise, o número de táxons do grupo externo foi reduzido. Neste caso, foram incluídas duas espécies de cada tribo de Stevardiinae, além de *Spintherobolus leptoura* e os táxons foram agrupados de acordo com os resultados obtidos na análise filogenética. No BEAUti v. 1.8.0, foi gerado o arquivo de entrada da análise, sob os seguintes parâmetros: modelo de substituição GTR+G, conforme encontrado por meio do PartitionFinder, modelo de relógio *Relaxed Clock Uncorrelated Lognormal*, árvore randômica de partida e *prior Speciation: Birth-Death Process*. Para a calibração, foi levado em consideração o registro fóssil de †*Megacheiroidon unicus* (Travassos & Santos), espécie de Characidae datada de 30-25 milhões de anos atrás (m.a.) (Oligoceno–Mioceno inferior) (Malabarba, 1998; Bührnheim *et al.*, 2008). De acordo com estes autores, †*M. unicus* é relacionado a *Spintherobolus* Eigenmann; assim, como não haviam dados das sequências de †*M. unicus* para inclusão na matriz, foram utilizadas as de uma espécie de

*Spintherobolus*, *S. leptoura*, onde a árvore foi enraizada. A calibração foi feita, portanto, em 27,5 m.a., datação média mínima estimada para a cladogênese ( $\dagger$ *Megacheirodon*, *Spintherobolus*), e *S. leptoura* foi indicado no BEAUTi como *stem group*, conforme sugerido por Forest (2009). A análise em si consistiu de duas corridas simultâneas de 100 milhões de gerações cada, com uma árvore salva a cada 10 mil gerações e *burn-in* de 20%. O desempenho e a convergência dos parâmetros entre as corridas foram analisados no programa Tracer v. 1.5.1 (Rambaut & Drummond, 2009), onde também foi checado o desempenho da análise (ESS>200). Depois da remoção do *burn-in*, as corridas independentes foram combinadas no LogCombiner v. 1.8.0 e a topologia consenso, com o tempo de divergência entre os clados, foi gerada no TreeAnnotator v. 1.8.0 e, posteriormente, visualizada e editada através do FigTree.

## 3. Resultados

### 3.1. Características das sequências e das matrizes de dados

No presente estudo, foram obtidas sequências parciais de três genes, sendo dois mitocondriais, 16S rRNA e COI, e um nuclear, RAG2. A matriz do 16S é composta por sequências de 672 indivíduos, sendo 341 pertencentes a *Glandulocaudini*, o que equivale a pouco mais de 50% do conjunto de dados. Na matriz do COI, foram incluídas sequências de 617 indivíduos, sendo 371 referentes ao grupo interno e 246 ao grupo externo. A matriz do RAG2 é composta por sequências de 269 espécimes, sendo 23 pertencentes a *Glandulocaudini* e 243 ao grupo externo. Já a matriz de dados concatenados (16S, COI e RAG2) é composta por 205 indivíduos, sendo 182 pertencentes ao grupo externo e 23 a *Glandulocaudini*. Para o grupo interno, os espécimes da matriz de dados concatenados foram os mesmos da matriz nuclear, sendo dois exemplares de *Lophobrycon weitzmani*, dois de *Glandulocauda melanopleura*, um de *G. caerulea*, dois de *Mimagoniates inequalis*, dois de *M. lateralis*, 11 de *M. microlepis*, um de *M. rheocharis* e dois de *M. sylvicola* (Apêndice A, Tabela 1). A lista das espécies utilizadas como grupo externo e a matriz de dados concatenados estão disponíveis no CD-ROM que acompanha esta tese.

Em nenhuma das matrizes, os dados foram considerados saturados, já que os valores dos Índices de Saturação de Substituição ( $I_{SS}$ ) obtidos foram menores que os índices de saturação críticos calculados ( $I_{SS} < I_{SS.C}$ ) em todos os genes. Em cada matriz final gerada, o número de sequências obtidas, seu tamanho (pb) após o alinhamento, número de sítios conservados (C) número de sítios variáveis (V) e o número de caracteres informativos (Pi) são apresentado na Tabela 2, abaixo.

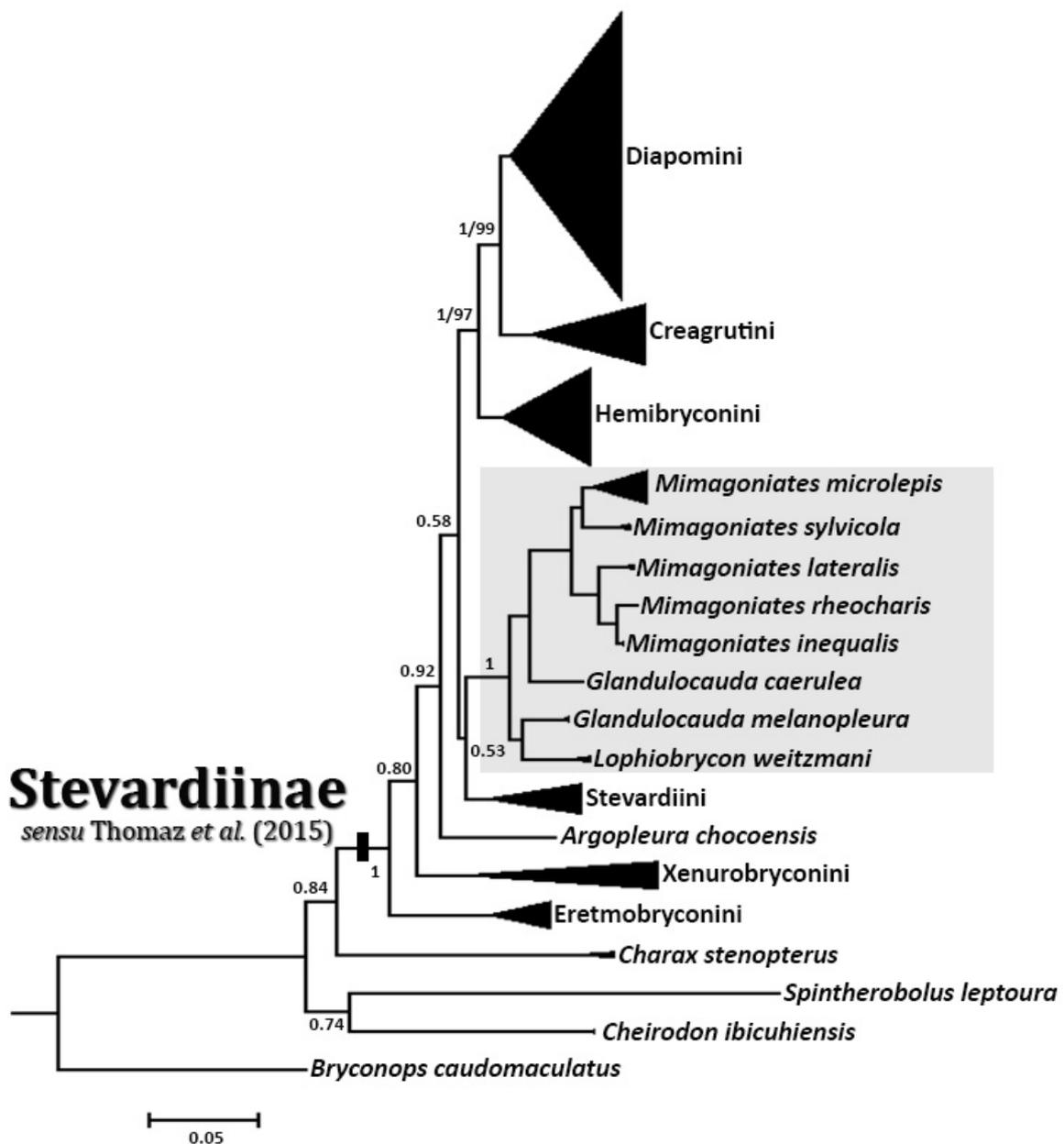
**Tabela 2.** Informações sobre as matrizes de dados geradas no presente estudo.

Informações	Matrizes			
	16S	COI	RAG2	Concatenada
Número de sequências	672	617	269	205
Tamanho (pb) após alinhamento	537	522	770	1829
Sítios conservados (C)	280	284	418	1063
Sítios variáveis (V)	245	238	351	745
Sítios informativos (Pi)	202	214	274	608

### 3.2. Análises filogenéticas: hipóteses baseadas na matriz de dados concatenados

A conformação geral das árvores e as relações obtidas através das análises de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV) da matriz de dados concatenados (16S, COI e RAG2, 1829 pb) são idênticas para o grupo interno. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a tribo Glandulocaudini constitui um grupo monofilético muito bem suportado estatisticamente (valores de probabilidade posterior e *bootstrap* = 1 e 100%, respectivamente) alocado dentro da subfamília Stevardiinae *sensu* Thomaz *et al.* (2015). Em relação ao grupo interno, a única diferença entre as topologias (IB e MV) refere-se à hipótese do grupo irmão de Glandulocaudini. Segundo a árvore baseada na análise de IB (Fig. 5), esta tribo é grupo irmão de Stevardiini. Já a hipótese, obtida através da análise de MV, aponta relação mais estreita entre Glandulocaudini e o clado (Hemibryconini (Creagrutini, Diapomini)) (Fig. 6). Como as relações propostas dentro de Glandulocaudini foram idênticas nas topologias obtidas em ambas as análises, para esta tribo, será apresentada apenas a árvore de IB, onde serão indicados nos respectivos clados formados, além dos valores de probabilidade posterior, os valores de *bootstrap* da análise de MV (Fig. 7). Em nenhuma das análises baseadas na matriz de dados concatenados, o gênero *Glandulocauda* aparece com uma unidade monofilética, uma vez que *G. melanopleura* é mais relacionada a *L. weitzmani*, enquanto sua única congênere, *G. caerulea*, forma um clado com as espécies de *Mimagoniates* analisadas. O suporte estatístico da relação (*G. melanopleura*, *L. weitzmani*) não foi considerado muito alto na análise de IB (=0,84), mas foi na análise de MV (90%). A relação (*G. caerulea*, *Mimagoniates* spp.), por sua vez, teve suporte estatístico elevado em ambas as análises, 0,99 de probabilidade posterior e 83% de *bootstrap*. As espécies de *Mimagoniates* analisadas formaram um grupo monofilético muito bem suportado estatisticamente (valores de probabilidade posterior e *bootstrap* = 1 e 100%, respectivamente). Entre as espécies deste gênero, os resultados de ambas

as análises (IB e MV) indicaram que *M. inequalis* é irmã de *M. rheocharis* e este clado está mais proximamente relacionado a *M. lateralis*, enquanto *M. sylvicola* formou um grupo monofilético com *M. microlepis*: (((*M. inequalis*, *M. rheocharis*) *M. lateralis*) (*M. microlepis*, *M. sylvicola*)). Os valores de suporte estatístico de todos os clados principais foram elevados (i.e., 1 de probabilidade posterior  $\geq 85\%$  de *bootstrap*). Em relação a *M. microlepis*, os espécimes das diferentes populações alopátricas analisadas formaram um clado, recuperado em ambas as análises realizadas com base na matriz de dados concatenados (IB e MV). Além disto, como será visto e detalhado no Capítulo 2 desta tese, as topologias obtidas também apontaram para uma forte estruturação dentro desta espécie.



**Figura 5.** Topologia sumarizada, obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados concatenados (16S + COI + RAG2, 1829 pb) mostrando as hipóteses de relação entre Glandulocaudini (em destaque) e grupo externo. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior.

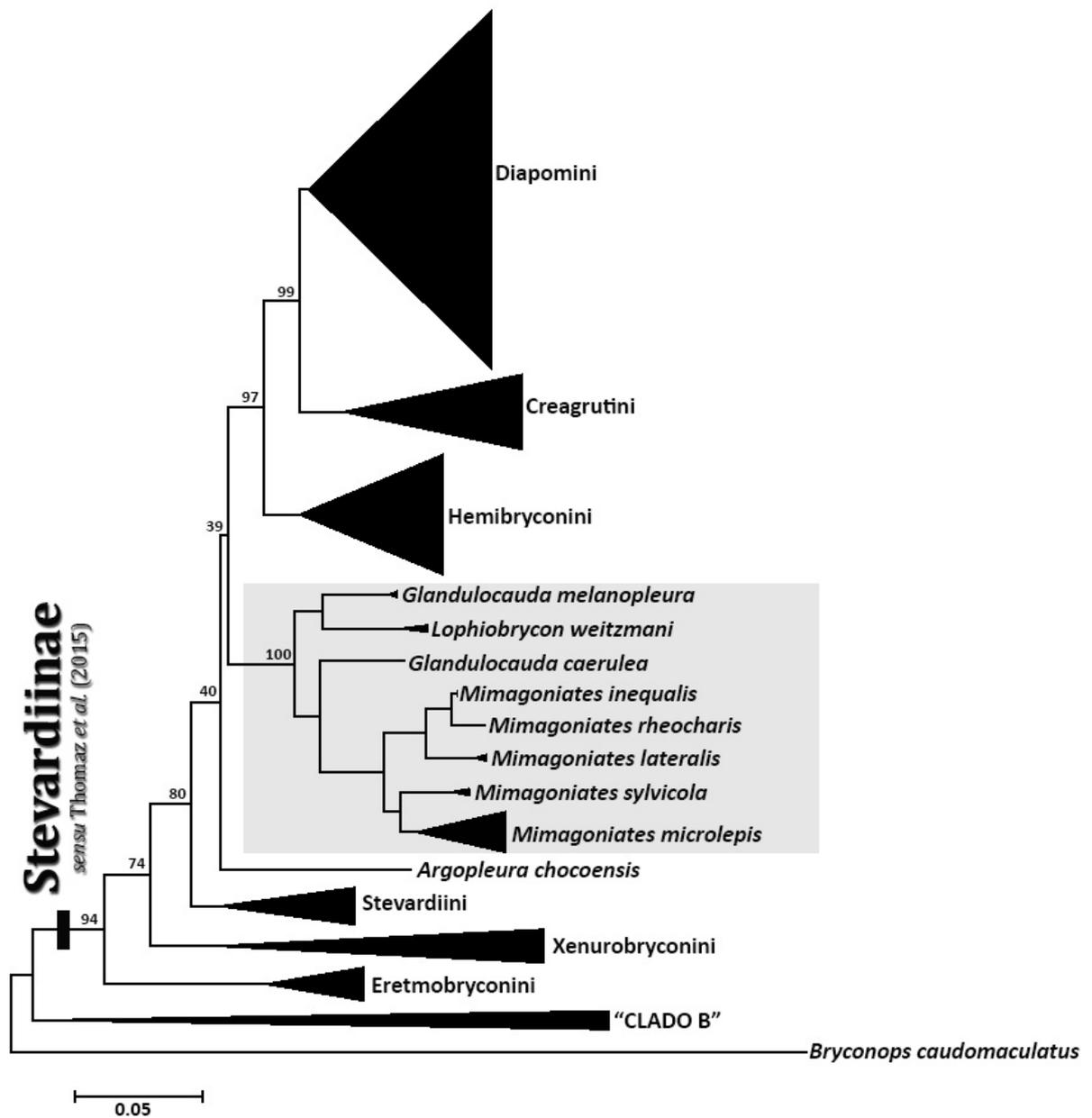
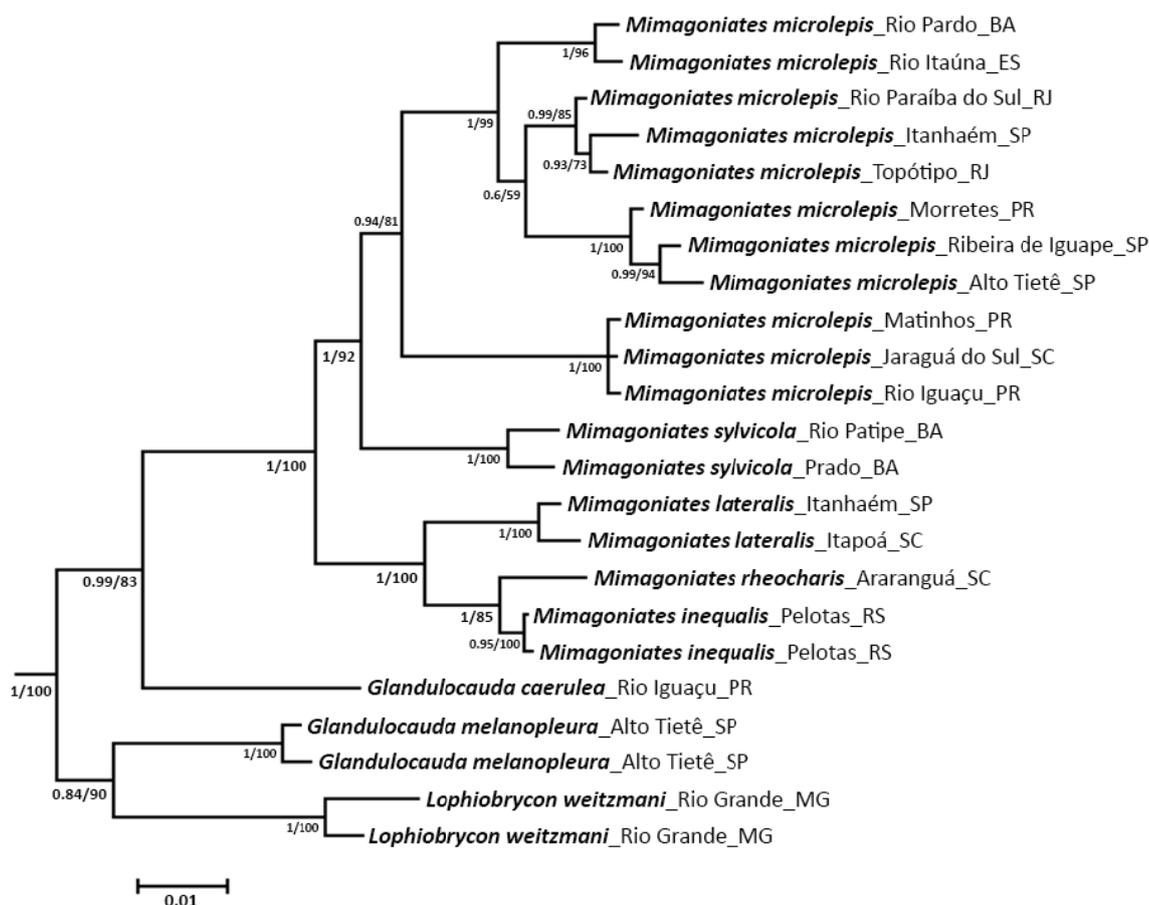


Figura 6. Topologia sumarizada, obtida através da análise de Máxima Verossimilhança da matriz de dados concatenados (16S + COI + RAG2, 1829 pb) mostrando as hipóteses de relação entre Glandulocaudini (em destaque) e grupo externo. Os números nos nós indicam os valores de *bootstrap* (%). "Clado B" refere-se ao agrupamento (*Charax* (*Cheirodon*, *Spintherobolus*)).

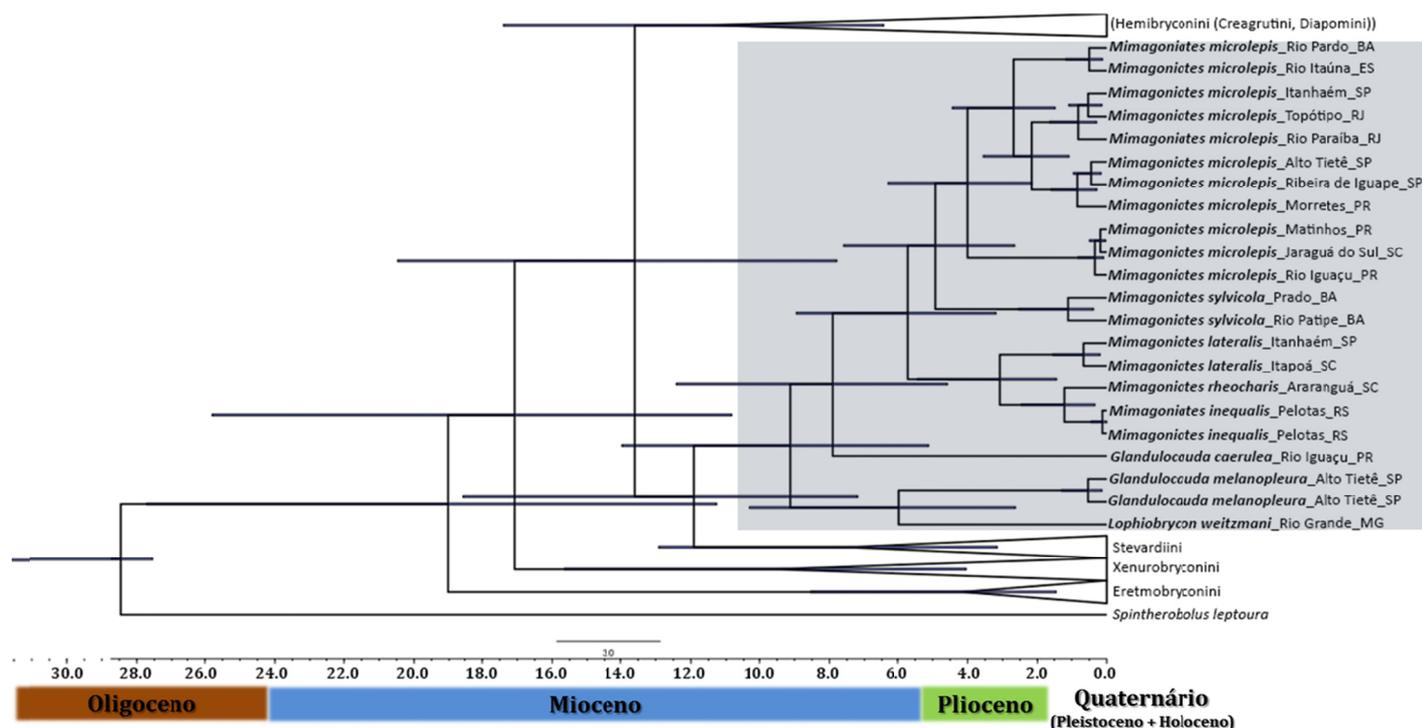


**Figura 7.** Parte da topologia obtida no presente estudo através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados concatenados (16S + COI + RAG2, 1829 pb), destacando as relações internas em Gandulocaudini. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente.

### 3.3. Tempos de divergência

De acordo com as datações obtidas a partir da análise de relógio molecular baseada na matriz de dados concatenados (Fig. 8), a linhagem ancestral que deu origem aos Gandulocaudini surgiu, provavelmente, durante o Mioceno (Neógeno), por volta de 11,9 m.a. [95%\_HPD= 18,5-7,2 m.a.]. A primeira grande cladogênese dentro da tribo também ocorreu durante o Mioceno, por volta de 9,1 m.a. [95%\_HPD= 13,9-5,1 m.a.] e culminou na separação entre os clados (*Lophiobrycon weitzmani*, *Glandulocauda melanopleura*) e (*G. caerulea*, *Mimagoniates* spp.). A segunda divergência ocorreu, segundo a análise realizada, há aproximadamente 7,9 m.a. [95%\_HPD= 12,4-4,6 m.a.] e culminou na separação de *G. caerulea* da linhagem ancestral que deu origem às diferentes espécies de *Mimagoniates* analisadas. Já o clado composto por *L. weitzmani* e *G. melanopleura* teve sua origem datada para o intervalo entre 10,3-2,6 m.a. [95%\_HPD] (média= 6,0 m.a.). Os eventos cladogenéticos em *Mimagoniates* tiveram início entre o final do Mioceno e o Plioceno (Neógeno) [média=5,7 m.a.; 95%\_HPD=8,9-3,2 m.a.]. A data de divergência entre *M. microlepis* e *M. sylvicola* indicou uma

separação no começo do Plioceno, há aproximadamente 4,9 m.a. [95%\_HPD= 7,6-2,6 m.a.]. Já a separação entre *M. lateralis* e a linhagem que deu origem ao clado (*M. inequalis*, *M. rheocharis*) se deu por volta de 3 m.a. atrás [95%\_HPD= 5,4-1,4 m.a.], também no Plioceno. *Mimagoniates inequalis* e *M. rheocharis*, por sua vez, divergiram bem recentemente, provavelmente, no Pleistoceno (Quaternário), há 1,2 m.a. [95%\_HPD= 2,4-0,3 m.a.].



**Figura 8.** Topologia calibrada a partir da análise de relógio molecular, indicando as estimativas de datas dos eventos cladogenéticos ocorridos em Glandulocaudini (em destaque). As barras nos nós representam 95% de HPD (*High Posterior Density*) dos tempos de divergência. O eixo X representa milhões de anos (m.a.).

## 4. Discussão

### 4.1. Filogenia molecular

#### 4.1.1. Hipóteses filogenéticas baseadas em dados concatenados

No presente estudo, foi realizada uma análise filogenética da tribo Glandulocaudini *sensu* Menezes & Weitzman (2009) e Thomaz *et al.* (2015) baseada em dados moleculares. Para esta análise, foram utilizadas sequências parciais de três genes, sendo dois mitocondriais (16S e COI) e um nuclear (RAG2), que foram concatenadas em uma matriz única de dados. A concatenação consiste, justamente, em anexar uma sequência de caracteres ao final de outra para a produção de uma matriz única, sendo feita, geralmente, entre diferentes genes

mitocondriais, para a criação de uma matriz mitocondrial única, ou entre genes mitocondriais e nucleares. A primeira prática, que tem embasamento teórico na natureza ligada do genoma mitocondrial, é extremamente comum e tem sido muito utilizada tanto em estudos filogeográficos quanto em estudos filogenéticos de diversos grupos animais (*e.g.*, Cabanne *et al.*, 2008; Thomé *et al.*, 2010; Batalha-Filho *et al.*, 2013; Hirschmann *et al.*, 2015; Batalha-Filho & Miyaki, 2016). A prática de concatenação de sequências de *loci* geneticamente separados (*e.g.*, mtDNA e nuDNA) em uma “supermatriz”, por sua vez, tem suas origens na década de 1990 e está embasada na ideia da “evidência total”, uma vez que a concatenação *multiloci* (aliada à inclusão de muitos táxons) foi pensada para maximizar o poder da análise em permitir inferências sobre a história das espécies (Edwards *et al.*, 2007). Uma das críticas mais comuns à reconstrução filogenética com base em dados moleculares diz respeito ao fato destas análises resultarem em árvore de genes, que não necessariamente representam uma árvore de espécies. Assim, apesar de existirem críticas ao método de concatenação de genes mitocondriais e nucleares, reconstruções filogenéticas baseadas nestas “supermatrizes” têm representado a forma mais utilizada para propor árvores de espécies com base em dados moleculares (*e.g.*, Rokas *et al.*, 2003; Gadagkar *et al.*, 2005; Degnan & Rosenberg, 2006; Kubatko & Degnan, 2007; Edwards *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2014; Tonini *et al.*, 2015). Muitos autores têm utilizado estas “supermatrizes”, obtidas a partir da concatenação de sequências de genes mitocondriais e nucleares, para estudos de sistemática molecular de diversos grupos de animais (*e.g.*, Brunet *et al.*, 2010, 2014; Pavan *et al.*, 2013; Batalha-Filho *et al.*, 2014; Lavinia *et al.*, 2015; Menezes *et al.*, 2015; Che *et al.*, 2016) e esta abordagem tem sido a mais utilizada para a proposição de hipóteses filogenéticas em táxons da ictiofauna de água doce Neotropical (*e.g.*, Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Roxo *et al.*, 2012, 2014; Thompson *et al.*, 2014; Thomaz *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016).

#### **4.1.2. Glandulocaudini Eigenmann *sensu* Menezes & Weitzman (2009) e Thomaz *et al.* (2015) como um grupo monofilético: análises diferentes, resultados semelhantes**

Apesar de classificação hierárquica distinta, a subfamília Glandulocaudinae *sensu* Menezes & Weitzman (2009) e a tribo Glandulocaudini *sensu* Thomaz *et al.* (2015) são equivalentes e incluem os gêneros *Glandulocauda*, *Lophobrycon* e *Mimagoniates*. No presente estudo, conforme já mencionado, foi adotada a classificação de tribo, pois, além de ser a proposta mais atual (Thomaz *et al.*, 2015), foi também a recuperada nas análises realizadas. Assim, as topologias (IB e MV) obtidas a partir da matriz de dados concatenados (16S, COI e

RAG2) indicaram que as espécies de *Glandulocauda*, *Lophiobrycon* e *Mimagoniates* analisadas constituem um clado muito bem suportado estatisticamente dentro de Stevardiinae *sensu* Thomaz *et al.* (2015). Aqui, é importante ressaltar que, apesar dos resultados não terem sido apresentados, as mesmas análises foram realizadas para cada um dos genes independentemente (16S, 537 pb; COI, 522 pb; RAG2, 770 pb) e, em todas elas, a tribo Glandulocaudini é recuperada como um grupo monofilético, com elevado valor de suporte estatístico.

Representantes de Glandulocaudini já foram incluídos em inúmeras análises filogenéticas, tanto baseadas em dados morfológicos (*e.g.*, Menezes & Weitzman, 1990, 2009; Castro *et al.*, 2003; Weitzman *et al.*, 2005; Menezes *et al.*, 2008; Mirande, 2010) quanto moleculares (*e.g.*, Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015). A grande maioria das análises baseadas em dados morfológicos incluiu todos os gêneros de Glandulocaudini, mas o mesmo não aconteceu com as análises moleculares e, em quase todos os estudos realizados, foram analisadas apenas espécies (ou uma espécie) de *Mimagoniates*. As exceções são os trabalhos de Oliveira *et al.* (2011) e Thomaz *et al.* (2015), que, ao estudarem as relações de parentesco dentro da família Characidae e subfamília Stevardiinae respectivamente, incluíram amostras de *Lophiobrycon*, *Glandulocauda* e *Mimagoniates*. Assim como os resultados aqui obtidos, todos os estudos mencionados, que incluíram representantes dos três gêneros de Glandulocaudini, sejam eles baseados em dados morfológicos ou moleculares, recuperaram a tribo como sendo um grupo monofilético. Aqui, é válido ressaltar que, mesmo nas hipóteses baseadas em dados morfológicos, realizadas antes da descrição de *Lophiobrycon* por Castro *et al.* (2003) (*e.g.*, Menezes & Weitzman, 1990; Weitzman & Menezes, 1998), o gênero *Glandulocauda* é considerado grupo irmão de *Mimagoniates*, formando o clado Glandulocaudini. De acordo com a hipótese morfológica mais atual (Menezes & Weitzman, 2009), baseada principalmente na análise de caracteres sexuais primários e secundários, o clado Glandulocaudini (na época, Glandulocaudinae) é sustentado por duas sinapomorfias: (1) presença de escamas modificadas, hipertrofiadas na porção terminal do pedúnculo caudal, que se estendem à nadadeira caudal a partir da região ventral do seu lobo dorsal e (2) presença de células glandulares na nadadeira caudal, histologicamente indistinguíveis das “células club” (*i.e.*, células de substância de alarme modificadas) e, provavelmente, associadas à produção de feromônio durante a corte. Estas sinapomorfias correspondem aos caracteres 3 e 4 de Menezes & Weitzman (2009: 300), sexualmente dimórficos, observados em machos maduros e sexualmente ativos. Segundo estes autores, o primeiro caráter (nº 3), apesar de presente, é pouco diferenciado em *Lophiobrycon*, já que a

hipertrofia das escamas nas espécies deste gênero é mais discreta, sendo considerada pelos autores como um possível estado plesiomórfico.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo aliados às informações disponíveis na literatura mencionadas anteriormente indicam que, em todas as análises filogenéticas realizadas até o momento, seja com base em dados morfológicos ou moleculares, *Lophibrycon weitzmani* e as espécies de *Glandulocauda* e *Mimagoniates* analisadas caem como proximamente relacionadas, formando um clado bem suportado, independente da sua categoria taxonômica.

#### **4.1.3. Posição de Glandulocaudini em Stevardiinae sensu Thomaz et al. (2015)**

Em relação ao grupo interno, a única diferença entre as topologias geradas com base nas análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança diz respeito ao clado proposto como grupo irmão de Glandulocaudini. De acordo com a hipótese baseada na análise de IB, esta tribo está mais relacionada a Stevardiini e o clado (Glandulocaudini, Stevardiini) é grupo irmão de (Hemibryconini (Diapomini, Creagrutini)) e este agrupamento maior está relacionado a *Argopleura chocoensis*, espécie considerada *insertae sedis* em Stevardiinae por Thomaz et al. (2015: 18). Já segundo a árvore proposta com base na análise de MV, a relação é (Glandulocaudini (Hemibryconini (Diapomini, Creagrutini))), que é grupo irmão de *A. chocoensis* e este clado maior está relacionado a Stevardiini. Os dados da topologia bayesiana são os que mais se assemelham aos apresentados por Thomaz et al. (2015: Fig. 3, página 8) (obtidos por MV), apesar de não ser exatamente idêntica. Segundo estes autores, (Glandulocaudini, Stevardiini) está relacionado a *Argopleura* e este clado é grupo irmão de (Hemibryconini (Diapomini, Creagrutini)). Aqui, no entanto, é válido ressaltar que, exceto com relação a (Hemibryconini (Diapomini, Creagrutini)), os valores de suporte de nenhum destes agrupamentos foi considerado alto, nem no presente estudo, nem no de Thomaz et al. (2015) (i.e., probabilidade posterior <0,95 e *bootstrap* <50%), indicando que o posicionamento de Glandulocaudini dentro de Stevardiinae é, de fato, controverso e precisa ser investigado mais a fundo. No presente estudo, optou-se por não discutir em detalhes esta questão (i.e., posição da tribo na subfamília), primeiro porque o objetivo do trabalho são as relações internas em Glandulocaudini, segundo porque, como mencionado no ‘Material & Métodos’, as sequências do grupo interno foram adicionadas à matriz de Thomaz et al. (2015) sem a checagem dos respectivos *vouchers* do grupo externo, que inclui as demais tribos de Stevardiinae. Aqui, no entanto, é válido ressaltar que, apesar da amostragem reduzida de táxons, estudos filogenéticos anteriores, tanto baseados em dados morfológicos (e.g., Mirande, 2010) quanto baseados em

dados moleculares (*e.g.*, Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011) apontam para relação mais estreita entre a(s) espécie(s) analisada(s) de *Glandulocaudini* e *Stevardiini sensu Thomaz et al.* (2015).

#### **4.1.4. Relações entre os gêneros de *Glandulocaudini*: incongruências entre as hipóteses morfológicas e moleculares**

Como mencionando anteriormente, as análises filogenéticas baseadas em dados morfológicos e moleculares são congruentes em relação ao monofiletismo de *Glandulocaudini*. Estas análises, no entanto, são discordantes no que diz respeito às relações entre os gêneros desta tribo. Segundo as topologias geradas com base em dados morfológicos (Castro *et al.*, 2003; Menezes & Weitzman, 2009), *Lophiobrycon* é grupo irmão do clado (*Glandulocauda*, *Mimagoniates*). Por outro lado, os estudos de filogenia molecular (Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015) apontam para relação mais estreita entre *Lophiobrycon* e *Glandulocauda*, sendo este clado grupo irmão de *Mimagoniates*. Corroborar ou refutar estas hipóteses com base nos resultados obtidos no presente estudo não é uma tarefa simples, visto que, na presente análise o gênero *Glandulocauda* não foi recuperado como uma unidade monofilética. Como será discutido com maiores detalhes adiante, estudos adicionais, incluindo análises morfológicas e moleculares, fazem-se necessários para corroborar ou refutar o parafiletismo deste gênero, proposto aqui pela primeira vez. No entanto, levando em consideração única e exclusivamente as topologias obtidas no presente estudo, os resultados aqui apresentados também rejeitam as hipóteses baseadas em dados morfológicos, uma vez que *G. melanopleura*, espécie-tipo do gênero, é considerada grupo-irmão de *L. weitzmani* e não das espécies de *Mimagoniates* analisadas.

De acordo com Menezes & Weitzman (2009), duas sinapomorfias sustentam o clado (*Glandulocauda*, *Mimagoniates*). A primeira (*i.e.*, caráter 7) diz respeito aos raios principais 11 e 12 da nadadeira caudal que nos machos sexualmente maduros destes gêneros, são curvados ventralmente (ver detalhes na descrição do caráter em Menezes & Weitzman, 2009: 300), ao passo que os de *Lophiobrycon* são retos. Aqui, é válido ressaltar que, apesar de Castro *et al.* (2003: 16) terem descrito os raios principais 11 e 12 da nadadeira caudal de *L. weitzmani* como “muito ligeiramente curvados na metade distal”, Menezes & Weitzman (2009) não observaram esta condição na espécie, mesmo analisando machos completamente maduros diafanizados e corados. Além desta sinapomorfia, no grupo externo e em *L. weitzmani*, o raio mais externo da nadadeira pélvica é indiviso, enquanto nas espécies de *Glandulocauda* e *Mimagoniates*, em

especial nos machos sexualmente maduros, este raio é ramificado na sua porção distal. É importante destacar que, apesar deste caráter (nº 8) ter sido proposto como sinapomorfia nestes gêneros na análise de Menezes & Weitzman (2009), ele tem se mostrado ser uma condição variável entre as diferentes espécies, conforme discutido pelos próprios autores (ver detalhes na descrição do caráter, página 301). Não fez parte do escopo deste trabalho reanalisar os caracteres morfológicos da matriz de Menezes & Weitzman (2009), mas os resultados obtidos a partir das análises moleculares, associados à variabilidade existente com relação às duas sinapomorfias propostas para (*Glandulocauda*, *Mimagoniates*) indicam que estudos morfológicos e moleculares adicionais podem ser interessantes para um entendimento mais completo da história evolutiva do grupo, bem como das relações entre os gêneros que o compõem. Em relação à segunda sinapomorfia de (*Glandulocauda*, *Mimagoniates*), por exemplo, a análise morfológica de um número maior de espécimes e de diferentes populações alopátricas de *Mimagoniates microlepis* e *Glandulocauda melanopleura*, realizadas nos Capítulos 2 e 3 desta tese, respectivamente, indicaram que a quantidade de raios indivisos/ramificados na nadadeira pélvica de machos maduros destas espécies é muito mais variável do que inicialmente proposto por Menezes & Weitzman (2009).

#### **4.1.5. O caso do gênero *Glandulocauda*: duas espécies não relacionadas**

O gênero *Glandulocauda* foi criado por Eigenmann (1911) para incluir *G. inequalis*, *G. melanogenys* (espécie tipo) e *G. melanopleura*. Atualmente, após uma série de mudanças taxonômicas, apresentadas em detalhe no Capítulo 3, fazem parte do gênero apenas as espécies *G. melanopleura* (= *G. melanogenys* de Eigenmann) e *G. caerulea*. (= *G. melanopleura* de Eigenmann). Em nenhuma hipótese filogenética proposta até o momento com base em caracteres morfológicos (e.g., Weitzman *et al.*, 1988; Menezes & Weitzman, 1990, 2009; Castro *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2008), a relação mais estreita entre estas duas espécies foi questionada e o gênero *Glandulocauda* sempre foi recuperado como uma unidade monofilética. Em relação às hipóteses baseadas em dados moleculares, o monofiletismo de *Glandulocauda* não pode ser discutido, uma vez que, em todos os estudos que incluíram o gênero (i.e., Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015), apenas sequências de *G. melanopleura* foram analisadas. Assim, no presente trabalho foi realizada a primeira análise filogenética com base em dados moleculares na qual foi incluída, além de *G. melanopleura*, a espécie *G. caerulea*.

Os resultados obtidos no presente estudo a partir de ambas as análises (IB e MV) indicaram que, diferentemente do que foi obtido através da análise dos caracteres morfológicos, o gênero *Glandulocauda* não representa uma unidade monofilética, uma vez que *G. melanopleura* é mais relacionada a *L. weitzmani*, enquanto *G. caerulea* forma um clado com as espécies de *Mimagoniates* analisadas. Aqui é importante ressaltar que, apesar dos resultados não terem sido apresentados, as mesmas análises foram realizadas para cada um dos genes independentemente (116S, 537 pb; COI, 522 pb; RAG2, 770 pb) e, em todas elas, o gênero *Glandulocauda* aparece como parafilético. Sobre estas análises, é válido também mencionar que apesar de na matriz concatenada, só ter sido incluído um espécime de *G. caerulea* (já que em apenas um, os três genes foram sequenciados, como indicado em 'Material & Métodos'), nas matrizes mitocondriais, sequências de mais indivíduos desta espécie foram inseridas, com o mesmo resultado. Ainda sobre as amostras utilizadas no presente estudo, é válido ressaltar que, tanto em *G. caerulea* quanto como em *G. melanopleura*, estas foram obtidas a partir de material coletado na localidade tipo ou adjacências, nas bacias dos rios Iguazu e Alto Tietê, respectivamente.

De acordo com a hipótese morfológica mais atual (Menezes & Weitzman, 2009), duas sinapomorfias, observadas nos machos sexualmente maduros, sustentam o clado (*G. melanopleura*, *G. caerulea*). A primeira é representada pelo estado 2 do caráter 7 mencionado anteriormente: raios principais 11 e 12 da nadadeira caudal ligeiramente curvados ventralmente, estágio inicial que caracteriza a formação de uma glândula em táxons mais derivados relacionados (Menezes & Weitzman, 2009: 301; Figs. 15 e 25, páginas 313 e 321, respectivamente). Já a segunda sinapomorfia do gênero (caráter 12, estado 2) é descrita por Menezes & Weitzman (2009: 301-302; Figs. 14 e 23, páginas 312 e 320, respectivamente) como raios principais 11 e 12 da nadadeira caudal ligeiramente curvados ventralmente; tecido glandular disperso ao longo dos raios principais 10-15 da nadadeira caudal. Conforme já mencionado, não faz parte dos objetivos do presente estudo realizar uma análise aprofundada dos caracteres morfológicos levantados e discutidos por Menezes & Weitzman (2009) para caracterizar Glandulocaudini como um todo. No entanto, indivíduos de *G. caerulea* e especialmente de toda a área de distribuição de *G. melanopleura* foram analisados no Capítulo 3 desta tese e, de fato, estas características, propostas como sinapomorfias do gênero na análise de Menezes & Weitzman (2009), foram observadas nos machos sexualmente maduros de ambas as espécies.

Das incongruências observadas entre a hipótese filogenética baseada em dados moleculares aqui proposta e aquela apresentada por Menezes & Weitzman (2009) obtida a

partir de evidências morfológicas, certamente o parafiletismo de *Glandulocauda* é a que mais se destaca. Em estudo recente com uma família de morcegos (Phyllostomidae), Dávalos *et al.* (2012) fizeram uma revisão extensa sobre incongruências filogenéticas, sejam elas entre topologias obtidas a partir de evidências morfológicas e moleculares, ou entre árvores propostas com base em conjunto distintos de dados moleculares (*e.g.*, mtDNA vs. nuDNA). Neste trabalho, os autores pontuam algumas das possíveis causas de incongruências entre topologias obtidas com base em dados morfológicos e moleculares e destacam, por exemplo, questões metodológicas, que incluem amostragem taxonômica e métodos analíticos. Em relação à amostragem taxonômica, os autores destacam não apenas a escolha dos táxons propriamente dita, como também a identificação correta dos *vouchers*. No presente estudo, em relação ao grupo interno, só foram utilizadas sequências gênicas de *vouchers* examinados e identificados com base nos caracteres diagnósticos de cada espécie, de maneira que ‘identificação errônea’ não parece ser o problema. Por outro lado, o grupo externo e o táxon utilizado para enraizamento das topologias moleculares aqui obtidas não foram os mesmos de Menezes & Weitzman (2009) e talvez esta seja uma questão relacionada à amostragem taxonômica que precisa ser revista. Os métodos analíticos, de fato, foram diferentes, ao passo que, no presente estudo, as topologias apresentadas foram obtidas através dos métodos probabilísticos de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana, enquanto Menezes & Weitzman (2009) utilizaram o método de Máxima Parcimônia (MP). Aqui, no entanto, é válido ressaltar que, justamente em função do posicionamento de *G. caerulea*, a matriz de dados concatenados (16S, COI e RAG2, 1829 pb) no presente estudo foi também analisada através do método de MP e as relações propostas para Glandulocaudini foram idênticas àquelas das análises de IB e MV. Pode ser que as incongruências encontradas entre as topologias sejam apenas reflexo da natureza distinta das matrizes de dados e que, caracteres moleculares e morfológicos, de fato, contem histórias diferentes em relação ao gênero, conforme já relatado em grupos de animais e plantas (*e.g.*, Sotiaux *et al.*, 2009; Tornow & Skelton, 2012). Por outro lado, a incongruência destes resultados é uma indicação de que talvez a história evolutiva dos glandulocaudíneos, mais especificamente do gênero *Glandulocauda*, seja mais complexa do que se imaginava. Assim, para um melhor entendimento desta história, bem como das relações de parentesco dentro de Glandulocaudini, sugere-se que dados morfológicos e moleculares sejam combinados para uma análise de evidência total, como tem sido feito em diversos grupos de peixes de água doce neotropicais nos últimos anos (*e.g.*, Farias *et al.*, 2000; Lovejoy *et al.*, 2010; Tagliacollo *et al.*, 2012; 2016). Segundo Hillis (1987), a combinação de estudos morfológicos e moleculares deve fornecer uma visão verdadeiramente abrangente e completa

da evolução da biota. Assim, tendo em vista a necessidade de estudos adicionais, tanto morfológicos quanto moleculares, nenhuma modificação taxonômica será feita dentro de *Glandulocauda* e os nomes *G. melanopleura* e *G. caerulea* serão mantidos por enquanto.

#### 4.1.6. O gênero *Mimagoniates* e as relações de parentesco entre suas espécies

No presente estudo, foram analisadas sequências gênicas de cinco das sete espécies de *Mimagoniates*, *M. lateralis*, *M. inequalis*, *M. microlepis*, *M. rheocharis* e *M. sylvicola*, que formaram um grupo monofilético com elevado suporte estatístico em ambas as análises (IB e MV, 1 de probabilidade posterior e 100% de *bootstrap*). De acordo com Menezes & Weitzman (2009), três sinapomorfias sustentam o monofiletismo de *Mimagoniates*: (1) presença de escamas alongadas na base do lobo dorsal da nadadeira caudal, que se estendem posteriormente como uma espécie de membrana, cobrindo (mas sem aderência) a região do tecido glandular (caráter 9, página 301); (2) nenhum ou apenas um gancho por raio da nadadeira anal de machos adultos (caráter 10, página 301); e (3) dentes do osso pré-maxilar dispostos em uma série irregular (caráter 11, página 301). Apesar de terem sido incluídas quase todas as espécies de *Mimagoniates*, os resultados aqui obtidos não permitem corroborar ou refutar a hipótese do seu monofiletismo, uma vez que não foram analisadas sequências de *M. barberi*, espécie tipo do gênero. A outra espécie não amostrada foi *M. pulcher*, descrita recentemente por Menezes & Weitzman (2009), com base em material coletado em 1934 em uma localidade incerta no Estado do Mato Grosso; até o momento, só é conhecido o material tipo desta espécie (holótipo, MNRJ 17814 e 28 parátipos, MNRJ 4233). A ausência de tecido e de sequências gênicas disponíveis no *GenBank* de *M. barberi* e *M. pulcher* inviabilizaram a inclusão delas nas análises realizadas no presente estudo. Ainda assim, é válido ressaltar que, entre os trabalhos de filogenia molecular em que foram incluídos representantes de *Glandulocaudini* (e.g., Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015), o presente estudo é o mais representativo do gênero *Mimagoniates*, com destaque para *M. sylvicola*, cujas sequências gênicas foram analisadas pela primeira vez.

De acordo com a hipótese morfológica mais atual (Menezes & Weitzman, 2009), as espécies de *Mimagoniates* estão divididas em dois clados, cujas relações internas não foram satisfatoriamente esclarecidas, sendo uma tricotomia, que inclui (*M. barberi*, *M. pulcher*, *M. inequalis*), e uma politomia formada por (*M. sylvicola*, *M. lateralis*, *M. microlepis*, *M. rheocharis*). As sinapomorfias que sustentam cada um destes clados são observadas nos machos sexualmente maduros e estão relacionadas aos raios principais 11 e 12 da nadadeira caudal (caráter 7) e ao órgão caudal bombeador de feromônio, presente também nesta

nadadeira (caráter 12). Nas espécies do clado (*M. barberi*, *M. pulcher*, *M. inequalis*), os raios 11 e 12 da caudal são fortemente curvados ventralmente e alargados, com a formação de um sulco entre eles (Menezes & Weitzman, 2009: 300-301, caráter 7, estado 2). Estes autores consideraram esta condição como intermediária entre aquelas observadas nos gêneros *Lophiobrycon* e *Glandulocauda* (estados 0 e 1, respectivamente) e aquela presente em (*M. sylvicola*, *M. lateralis*, *M. microlepis*, *M. rheocharis*) (estado 3). Nas espécies desta politomia, estes raios, além de curvados ventralmente, são modificados em uma espécie de suporte para o órgão caudal, em uma complexa associação com os raios 9, 10 e 13, que também são modificados. O órgão caudal de (*M. barberi*, *M. pulcher*, *M. inequalis*) apresenta uma condição rudimentar e o tecido glandular está principalmente concentrado sobre e ao redor dele (Menezes & Weitzman, 2009: 301, caráter 12, estado 3). Já nos machos sexualmente maduros de (*M. sylvicola*, *M. lateralis*, *M. microlepis*, *M. rheocharis*), os raios 11 e 12 da nadadeira caudal são curvados ventralmente, modificados e formam um complexo e bem desenvolvido órgão bombeador de feromônio (glândula); o tecido glandular é hipertrofiado e está restrito à área localizada imediatamente ao redor e sobre a região da “bomba caudal” (Menezes & Weitzman, 2009: 301-302, caráter 12, estado 4).

No presente estudo, nenhuma politomia foi encontrada entre as cinco espécies de *Mimagoniates* analisadas. Os resultados obtidos apontam para uma relação mais estreita entre *M. inequalis* e *M. rheocharis*, que formam um clado relacionado a *M. lateralis*, enquanto *M. sylvicola* e *M. microlepis* são consideradas espécies irmãs. A ausência de resolução da topologia apresentada por Menezes & Weitzman (2009) e a não inclusão de *M. barberi* e *M. pulcher* no presente estudo dificultam a comparação entre os dois resultados. Das reconstruções filogenéticas baseadas em evidências moleculares (e.g., Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015), apenas as de Javonillo *et al.* (2010), relativa à família Characidae, e Thomaz *et al.* (2015), abordando a subfamília Stevardiinae, incluíram mais de duas espécies de *Mimagoniates*. As topologias apresentadas em ambos os trabalhos foram baseadas na matriz de dados concatenados, incluindo tanto genes mitocondriais quanto nucleares. Os resultados obtidos no presente estudo e no trabalho de Javonillo *et al.* (2010) são concordantes em relação ao clado (*M. inequalis*, *M. rheocharis*), mas discordantes a respeito da relação (*M. microlepis*, *M. lateralis*) proposta por estes autores. Entretanto, é válido ressaltar que Javonillo *et al.* (2010) não analisaram sequências de *M. sylvicola*, espécie aqui proposta como sendo grupo irmão de *M. microlepis*. Já Thomaz *et al.* (2015) incluíram apenas três espécies de *Mimagoniates* e propuseram a seguinte hipótese de relação (*M. microlepis* (*M.*

*inequalis*, *M. rheocharis*)), de maneira que nenhuma incongruência foi evidenciada em relação à topologia aqui apresentada.

Em relação à hipótese morfológica de Menezes & Weitzman (2009), é importante mencionar que, conforme destacado pelos próprios autores, esta se baseou, principalmente, na análise de caracteres sexuais primários e secundários de machos adultos. No total, Menezes & Weitzman (2009) levantaram 14 caracteres, mas estes não foram suficientemente esclarecedores com relação às espécies de *Mimagoniates*, em virtude das politomias observadas. Assim, para um melhor entendimento das relações internas em *Mimagoniates*, sugere-se a realização de uma análise de evidência total ampla, que inclua, além dos dados moleculares, um número maior de caracteres morfológicos do que aqueles já utilizados em hipóteses prévias.

#### **4.2. Biogeografia de Glandulocaudini: padrão de distribuição e tempos de divergência**

Embora tenham sido realizados diversos trabalhos sobre sistemática e biogeografia de Glandulocaudini (e.g., Menezes & Weitzman, 1990, 2009; Menezes *et al.*, 2008), que representam avanço considerável no conhecimento do grupo, amostragens recentes revelaram aspectos inéditos relativos, principalmente, ao padrão de distribuição de algumas das suas espécies. Estas informações serão apresentadas a seguir e discutidas, sempre que possível, com base em informações geomorfológicas disponíveis e nas datações estimadas no presente estudo através da análise de relógio molecular.

Conforme já mencionado, os gêneros *Glandulocauda* e *Lophiobrycon* têm distribuição aparentemente restrita a riachos que drenam terras altas do escudo cristalino brasileiro, enquanto as espécies de *Mimagoniates* ocorrem, no geral, em terras baixas, principalmente na planície litorânea (Castro *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2008; Menezes & Weitzman, 2009). O gênero *Lophiobrycon*, que compreende uma única espécie, *L. weitzmani*, era considerado endêmico de riachos de cabeceiras da bacia do rio Grande, afluente do alto rio Paraná (Castro *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2008, Menezes & Weitzman, 2009). Recentemente (2011), no entanto, foram coletados exemplares de *L. weitzmani* (LBP 11820) em um pequeno tributário do alto curso da bacia do rio São Francisco, em São Roque de Minas, no Estado de Minas Gerais. Parte deste material foi examinada no presente estudo e, de fato, trata-se da espécie, de maneira que este é o primeiro registro da *L. weitzmani* fora da bacia do alto Paraná. No entanto, ainda assim, *Lophiobrycon* continua tendo distribuição restrita a riachos de planalto, em terras altas da porção sudeste do escudo cristalino brasileiro (Fig. 9). No presente estudo, não foi possível extrair material genético do material coletado na bacia do rio São Francisco, de maneira que sequências desta população não puderam ser incluídas nas análises filogenéticas e de relógio

molecular. De qualquer forma, o compartilhamento de *L. weitzmani* entre cabeceiras destas duas bacias é mais um indício das relações históricas entre o alto rio Paraná e o alto São Francisco, já mencionadas por diversos autores (e.g., Ribeiro, 2006; Buckup, 2011). Justamente por estarem restritos aos corpos d'água em que ocorrem, os peixes estritamente de água doce, como aqueles da tribo Glandulocaudini, dependem de conexões diretas entre as bacias hidrográficas para aumentar sua dispersão, de maneira que é esperada uma forte relação entre a história das bacias e sua ictiofauna (Weitzman & Weitzman, 1982; Hischmann *et al.*, 2015). Aqui, destacam-se os eventos de capturas fluviais, que atuam, reconhecidamente, como um importante processo biogeográfico e cladogenético em táxons de água doce (Mayden, 1988; Ribeiro, 2006; Waters *et al.*, 2006). De acordo com Ribeiro (2006), a origem e movimentação tectônica do gráben (ou fossa tectônica) de Taubaté pode ter resultado em diversas capturas de cabeceiras entre drenagens adjacentes no escudo cristalino brasileiro, tais como os rios Tietê, Grande (localidade tipo de *L. weitzmani*) e São Francisco. Buckup (2011) também sugere uma conexão geologicamente recente entre as bacias dos rios Paraná e São Francisco, especialmente através da drenagem do rio Grande, que teria possibilitado o intercâmbio de fauna entre estas drenagens. Segundo este autor, mais de 80% das espécies de peixes compartilhadas entre a bacia do rio São Francisco e Paraná ocorrem no rio Grande, o que corresponde a mais de da metade das espécies da ictiofauna desta bacia.

No presente estudo, o gênero *Glandulocauda* não foi corroborado como monofilético, mas, conforme já discutido, análises adicionais (morfológicas e moleculares) se fazem necessárias para testar esta hipótese e então, se for o caso, propor mudanças taxonômicas para as espécies do gênero. Independentemente destas questões ou do nome que elas recebam, tanto *G. caerulea* quanto *G. melanopleura*, são, aparentemente, endêmicas de riachos que drenam terras altas do escudo cristalino brasileiro. *Glandulocauda caerulea* foi descrita do alto rio Iguazu, um dos principais afluentes da bacia do Paraná, e tem ocorrência registrada para a parte sudeste do escudo cristalino brasileiro, nos Estados do Paraná e Santa Catarina (Ribeiro, 2006; Menezes *et al.*, 2008; Menezes & Weitzman, 2009). Como será visto em detalhes no Capítulo 3, a distribuição de *G. melanopleura* é bem mais ampla do que se tinha conhecimento até então e a espécie, que foi descrita do Alto Tietê, também tem distribuição registrada em áreas adjacentes à localidade tipo, nas porções altas dos rios costeiros Guaratuba, Itanhaém, Itatinga e Ribeira do Iguape (Ribeiro *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2007; Serra *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2008; Menezes & Weitzman, 2009). Aqui, é importante ressaltar que, mesmo com relação às populações de *G. melanopleura* que ocorrem em bacias costeiras, a distribuição da espécie está restrita às porções altas destas bacias, localizadas no escudo cristalino brasileiro.

Assim, até o momento, não foram encontradas populações de *Glandulocauda* na planície litorânea.

Assim como no caso de *Glandulocauda* e *Lophiobrycon*, as espécies de *Mimagoniates* têm, predominantemente, distribuição restrita, com um alto grau de endemismo reconhecido. No entanto, diferente dos demais, típicos de regiões de elevadas altitudes do escudo cristalino brasileiro, o gênero *Mimagoniates* ocorre, no geral, em áreas baixas de planície litorânea, em drenagens costeiras desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Weitzman *et al.*, 1988; Menezes *et al.*, 2008; Menezes & Weitzman, 2009). Como será visto em detalhes no Capítulo 2, a única espécie que apresenta padrão de distribuição diferenciado é *M. microlepis*, que, além de ser amplamente distribuída em rios e riachos costeiros desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, também distribui-se em regiões mais altas, no escudo cristalino brasileiro, em tributários dos rios Iguaçu e Tietê, afluentes do alto rio Paraná. Ainda sobre a distribuição das espécies de *Mimagoniates*, é válido ressaltar o caso de *M. sylvicola*. De acordo com Menezes *et al.* (2007) e Menezes & Weitzman (2009), a espécie, que foi descrita de um pequeno riacho na cidade de Prado, extremo sul da Bahia, tem distribuição conhecida apenas em pequenas drenagens entre esta cidade e Porto Seguro (BA). Expedições recentes em outras bacias do estado, entretanto, indicaram que a distribuição de *M. sylvicola* é bem mais ampla do que se tinha conhecimento e a espécie também ocorre em riachos ao norte de Porto Seguro, sempre muito próximo ao litoral. No sentido sul-norte, foram coletados exemplares de *M. sylvicola* na bacia do rio Pardo (MZUSP 112657 e 112679), em pequenas drenagens da região do Recôncavo Sul, entre as cidades de Valença e Salvador (MZUSP 112691; UFBA 5780, 6295, 7004) e também na bacia do rio Real, já na divisa com o Estado de Sergipe (MZUSP 115092), que passa a ser o limite norte de distribuição da tribo Glandulocaudini, cujo padrão de distribuição atualizado é apresentado na Fig. 9. A distribuição disjunta de *M. sylvicola* aliado aos processos de degradação ambiental que reconhecidamente ocorreram não apenas na área de ocorrência da espécie, mas em toda a planície litorânea do leste do Brasil (Menezes *et al.*, 2007), sugerem que *M. sylvicola*, provavelmente, ocorria de maneira contínua ao longo de riachos costeiros da Bahia, mas que extinções locais foram responsáveis pelo atual padrão disjunto de distribuição da espécie. Aqui, é importante destacar que, apesar da falha de amostragem ser uma possibilidade, os inúmeros esforços de coleta e análise de material de drenagens deste estado (*e.g.*, Camelier, 2010; Burger *et al.*, 2011; Camelier & Zanata, 2014) indicam que talvez este não seja o caso.

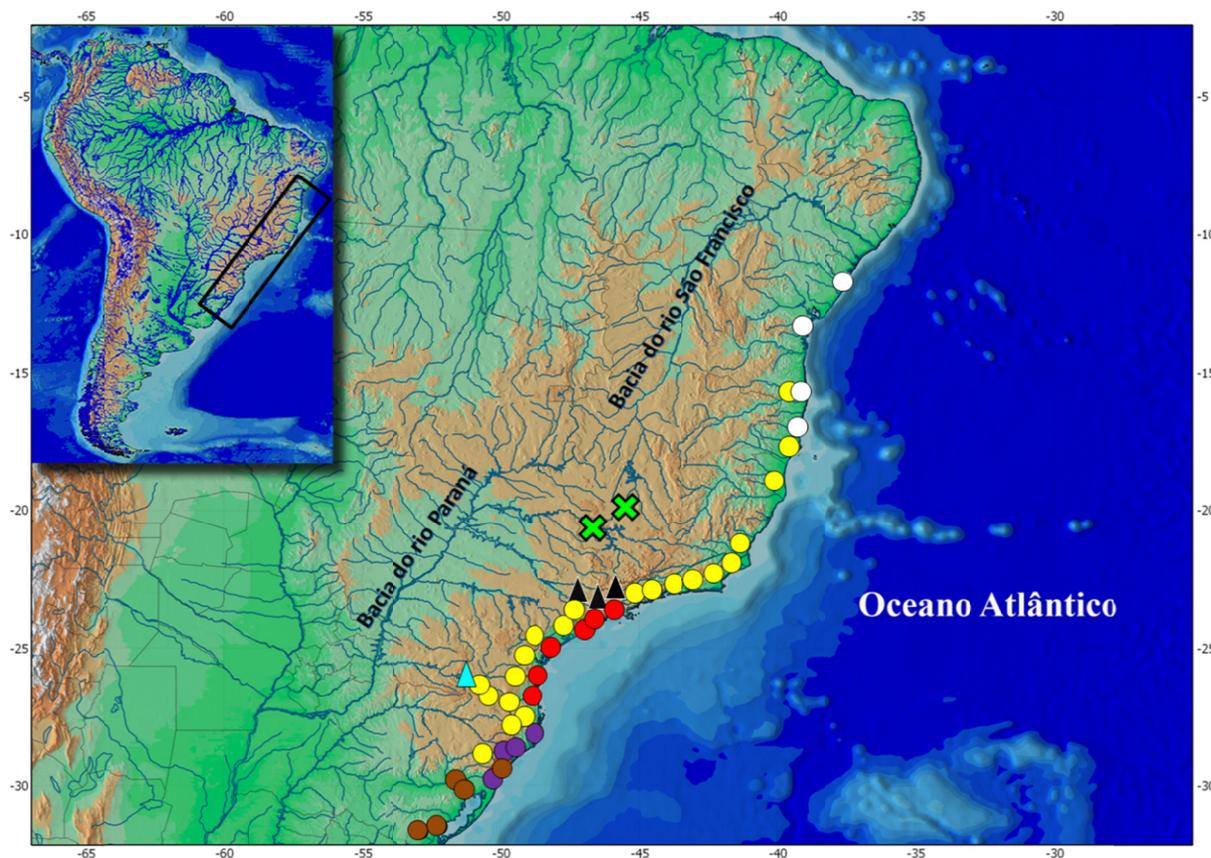


Figura 9. Mapa de distribuição dos gêneros e espécies de Glandulocaudini analisados no presente estudo. O X representa *Lophiobrycon weitzmani*; os triângulos o gênero *Glandulocauda*, *G. melanopleura* em preto e *G. caerulea* em azul; os círculos indicam as espécies de *Mimagoniates*, no sentido norte-sul: *M. sylvicola* (branco), *M. microlepis* (amarelo), *M. lateralis* (vermelho), *M. rheocharis* (roxo) e *M. inequalis* (marrom). Este mapa está atualizado em relação ao apresentado por Menezes *et al.* (2008), com base em informações disponibilizadas por Menezes & Weitzman (2009) e obtidas no presente estudo.

De acordo com Ribeiro *et al.* (2016), Glandulocaudini provavelmente é o grupo de peixes de água doce melhor estudado do ponto de vista biogeográfico. A biogeografia de Glandulocaudini propriamente dita foi discutida por Weitzman *et al.* (1988), Menezes & Weitzman (1990) e, mais recentemente, foi revisada por Menezes *et al.* (2008), tendo como base os estudos das relações filogenéticas conhecidas na época e informações geomorfológicas. A topologia resultante das análises de IB e MV com base na matriz de dados concatenadas, necessária para análise de relógio molecular realizada no presente estudo, corroborou o monofiletismo de Glandulocaudini, conforme já indicado por estes autores e também por Menezes & Weitzman (2009). No entanto, as relações entre os gêneros/espécies não foram exatamente as mesmas, de maneira que a discussão apresentada a seguir sobre tempo de divergência entre os táxons será feita com base na topologia ((*Glandulocauda melanopleura*, *Lophiobrycon*) (*Glandulocauda caerulea*, *Mimagoniates*)).

De acordo com a calibração do relógio molecular aqui proposto, a primeira grande cladogênese dentro de Glandulocaudini ocorreu no Mioceno, por volta de 9 m.a., que culminou com a separação entre os clados (*Lophiobrycon weitzmani*, *Glandulocauda melanopleura*) e (*G. caerulea*, *Mimagoniates* spp.). O primeiro deles inclui espécies restritas a riachos que drenam o escudo cristalino brasileiro e o segundo é formado tanto por uma espécie de escudo (*G. caerulea*) como por espécies de *Mimagoniates*, distribuídas, primordialmente, ao longo da planície costeira do leste do Brasil. A segunda divergência ocorreu, segundo a análise realizada, há quase 8 m.a. e culminou na separação de *G. caerulea* da linhagem ancestral que deu origem às diferentes espécies de *Mimagoniates* analisadas. Os eventos cladogenéticos neste gênero tiveram início no final do Terciário e perduraram até recentemente, no Pleistoceno. Diversos autores já discutiram o padrão de distribuição de Glandulocaudini como um todo ou de algumas das suas espécies (e.g., Weitzman *et al.*, 1988; Menezes & Weitzman, 1990; Ribeiro, 2006; Ribeiro *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2008) e a maioria dos trabalhos sugere que a diversificação inicial do grupo se deu no antigo escudo cristalino brasileiro, em terras altas, drenadas pela paleodrenagem do alto rio Paraná, sendo a ocupação das terras baixas, incluindo e as drenagens costeiras do leste do Brasil, mais recente. Os resultados obtidos no presente estudo ajudam a corroborar tal hipótese, já que os eventos cladogenéticos mais antigos ocorreram entre linhagens desta tribo que ficaram restritas ao escudo cristalino. Segundo Menezes *et al.* (2008), a ocorrência restrita e distribuição alopátrica de *Glandulocauda* e *Lophiobrycon* sugerem um padrão de distribuição relictual associado a uma linhagem ancestral, que estava amplamente distribuída no alto Paraná. A hipótese de que a parte superior da atual bacia do Paraná seja uma área biogeográfica antiga é fortemente apoiada por evidências geológicas (Menezes *et al.*, 2008). Segundo Ribeiro (2006), processos erosivos contínuos ao longo da margem leste da escarpa da Serra do Mar teriam sido responsáveis pela transferência de estoques ancestrais das terras altas, como, por exemplo, da bacia do alto Paraná para os rios de planície, onde os grupos seriam submetidos a um processo de diversificação subsequente. Apesar de Weitzman *et al.* (1988) reconhecerem a importância dos eventos de capturas de cabeceira na distribuição das espécies de Glandulocaudini, estes autores sugerem que a atual diversificação do grupo tenha sido moldada, principalmente, pelas flutuações do nível do mar ocorridas no Pleistoceno. Assim, de acordo com a hipótese destes autores, o recuo do mar teria permitido a dispersão de um ancestral comum entre as drenagens costeiras, que estariam potencialmente conectadas ao longo da plataforma continental; a ascensão do nível do mar teria promovido a separação destas drenagens e o consequente isolamento das suas populações, que se tornaram isoladas, possibilitando assim, eventos de especiação. De acordo com Menezes

*et al.* (2008) e Ribeiro *et al.* (2016), no entanto, o conhecimento mais recente do grupo e, principalmente, de aspectos da evolução tectônica da parte cisandina da América do Sul, possibilita uma explicação diferente. Segundo estes autores, o cenário seria é exatamente o oposto do proposto por Weitzman *et al.* (1988), apesar de ter sido reconhecida a importância das flutuações do nível do mar na distribuição geográfica do grupo, a diversificação atual de Glandulocaudini seria resultante, principalmente, de reativações tectônicas ao longo da margem oriental do escudo cristalino brasileiro, uma área sujeita a levantamento tectônico recente, que pode ter proporcionado contato entre os rios costeiros e afluentes da parte alta adjacente a leste do alto rio Paraná. A datação estimada no presente estudo para a primeira cladogênese em *Mimagoniates* corrobora a hipótese mais recente de Menezes *et al.* (2008), uma vez que a primeira grande separação dentro do grupo data do Mioceno-Plioceno (Terciário), sendo mais antiga do que as flutuações do nível do mar, ocorridas no Pleistoceno (Quaternário). Como será discutido em detalhes no Capítulo 2, o papel das flutuações pleistocênicas do nível do mar na distribuição das espécies de Glandulocaudini, mais especificamente do gênero *Mimagoniates*, que ocorre próximo ao litoral, parece ter maior destaque em nível populacional, sendo as principais responsáveis pela distribuição atual estruturada encontrada hoje em algumas espécies do gênero, como *M. microlepis*, por exemplo.

A topologia e a datação proposta para as primeiras cladogêneses em Glandulocaudini também corroboram a hipótese de que este grupo seja um exemplo do “padrão biogeográfico B” proposto por Ribeiro (2006), como já indicado por este autor. De acordo com ele, neste padrão, podem ser incluídos gêneros de peixes de água doce ocorrentes em drenagens costeiras do leste do Brasil, onde são mais diversos em número de espécies (no caso, *Mimagoniates*), cujo(s) grupo(s) irmão(s) apresenta(m) um número menor de espécies, distribuído de maneira restrita em rios de planalto do escudo cristalino brasileiro (no caso, *Glandulocauda* e *Lophiobrycon*). De acordo com este autor, os táxons incluídos neste padrão apresentam uma história biogeográfica intermediária, resultante do contínuo intercâmbio faunístico entre rios de planalto do escudo cristalino brasileiro e rios costeiros do leste do Brasil ao longo do Terciário.

## 5. Conclusões

No presente estudo foi realizada uma análise de filogenia molecular de Glandulocaudini, uma tribo de peixes de água doce da subfamília Stevardiinae (Characidae), que está distribuída, principalmente, em partes do leste e sul do Brasil, mas também no

Paraguai e nordeste do Uruguai. As topologias resultantes das análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança, obtidas através de uma matriz de dados concatenados (genes mitocondriais, 16S rRNA e COI, e gene nuclear RAG2), foram concordantes a respeito do monofiletismo da tribo, indicando que os gêneros *Glandulocauda*, *Lophiobrycon* e *Mimagoniates* estão proximamente relacionados e formam um clado muito bem suportado. Este resultado é congruente com hipóteses filogenéticas propostas previamente para o grupo, tanto com base em dados morfológicos quanto com base em evidências moleculares. Aqui, é importante mencionar que, nestas últimas, o foco dos estudos não era Glandulocaudini, de maneira que o presente trabalho representa a primeira análise de filogenia molecular que tem como foco as relações internas da tribo. Os glandulocaudíneos incluem dez espécies e, no presente estudo, foram analisadas sequências gênicas de oito delas, sendo este o estudo baseado em dados moleculares que incluiu o maior número de representantes do grupo até o momento. Ainda sobre amostragem, é válido também mencionar que sequências das espécies *Glandulocauda caerulea* e *Mimagoniates sylvicola* foram analisadas pela primeira vez. Diferentemente do proposto por meio da análise baseada em dados morfológicos, os resultados do presente estudo indicaram que o gênero *Glandulocauda* não é monofilético, visto que *G. melanopleura* foi considerada grupo irmão de *L. weitzmani* enquanto a sua única congênera, *G. caerulea*, formou um clado com as espécies de *Mimagoniates* analisadas. Em virtude das incongruências entre os resultados obtidos a partir das evidências morfológicas e moleculares, não foi proposta nenhuma modificação nomenclatural ou taxonômica em *Glandulocauda*, até que análises adicionais sejam realizadas. Aqui, é proposta uma análise de evidência total, na tentativa de esclarecer as incongruências de resultados a respeito de *Glandulocauda* e também para que se tenha um entendimento mais completo da história evolutiva e das relações de parentesco da tribo como um todo. Foram obtidas sequências de cinco das sete espécies de *Mimagoniates*, que formaram um grupo monofilético, conforme já indicado através das análises baseadas em dados morfológicos. Os resultados obtidos no presente estudo, entretanto, não são suficientes para corroborar a hipótese de monofiletismo do gênero, visto que amostras de *M. barberi*, espécie tipo do gênero, não foram incluídas nas análises. A hipótese morfológica filogenética atual de Glandulocaudini não esclareceu de maneira satisfatória as relações entre as espécies de *Mimagoniates*. No presente estudo, não foi encontrada nenhuma politomia e a relação proposta para as espécies do gênero é ((*M. microlepis*, *M. sylvicola*) (*M. lateralis* (*M. inequalis*, *M. rheocharis*))). Mais uma vez, sugere-se uma análise combinada de dados morfológicos e moleculares para melhor compreensão das relações dentro do gênero. Neste caso, mesmo que não seja possível obter sequências gênicas das espécies de *Mimagoniates*

faltantes, em especial *M. pulcher* (pelas razões mencionadas na discussão), estas espécies poderão ser analisadas do ponto de vista morfológico. As datações propostas através da análise de relógio molecular indicaram que a diversificação de Glandulocaudini teve início no Neógeno e que os primeiros eventos cladogenéticos na tribo resultaram nas espécies que, atualmente, têm distribuição restrita a riachos que drenam as partes altas do escudo cristalino brasileiro. Estes riachos ou são tributários do alto curso da bacia do rio Paraná ou das cabeceiras de drenagens costeiras próximas, indicando que, muito provavelmente, a origem e diversificação do grupo tiveram início nesta região, com ocupação das áreas de planície posteriormente, conforme já proposto por alguns autores. Eventos de capturas de cabeceiras teriam sido responsáveis pela ocorrência das espécies de Glandulocaudini nas drenagens costeiras do leste do Brasil. As flutuações do nível do mar, ocorridas mais recentemente também influenciaram o atual padrão de distribuição das espécies do grupo, mas, aparentemente, tiveram maior significância em nível populacional.

## 6. Referências Bibliográficas

- Awise, J. C. 2004. **Molecular markers, Natural history, and Evolution**. Massachusetts, Sinauer Associates Inc. 684p.
- Batalha-Filho, H. & C. Y. Miyaki. 2016. Late Pleistocene divergence and postglacial expansion in the Brazilian Atlantic Forest: multilocus phylogeography of *Rhopias gularis* (Aves: Passeriformes). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, doi: 10.1111/jzs.12118.
- Batalha-Filho, H., M. Irestedt, J. Fjeldsa, P. G. P. Ericson, L. F. Silveira & C. Y. Miyaki. 2013. Molecular systematics and evolution of the *Synallaxis ruficapilla* complex (Aves: Furnariidae) in the Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 67: 86-94.
- Batalha-Filho, H., R. O. Pessoa, P-H. Fabre, J. Fjeldsa, M. Irestedt, P. G. P. Ericson, L. F. Silveira & C. Y. Miyaki. 2014. Phylogeny and historical biogeography of gnateaters (Passeriformes, Conopophagidae) in the South America forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.06.025>.
- Buckup, P. A. 2011. The Eastern Brazilian Shield. In: Albert, J. S. & R. E. Reis (Eds.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley, University of California Press, cap. 12, p. 203-210
- Burger, R., A. M. Zanata & P. Camelier. 2011. Estudo taxonômico da ictiofauna de água doce da bacia do Recôncavo Sul, Bahia, Brasil. **Biota Neotropica**, 11(4): 273-290.

- Brunes, T. O., F. Sequeira, C. F. B. Haddad, J. Alexandrino. 2010. Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 57: 1120-1133.
- Brunes, T. O., J. Alexandrino, D. Baêta, J. Zina, C. F. B. Haddad & F. Sequeira. 2014. Species limits, phylogeographic and hybridization patterns in Neotropical leaf frogs (Phyllomedusinae), **Zoologica Scripta**, doi:10.1111/zsc.12079.
- Bührnheim, C. M., T. P. Carvvalho, L. R. Malabarba & S. H. Weitzman. 2008. A new genus and species of characid fish from the Amazon basin - the recognition of a relictual lineage of characid fishes (Ostariophysi: Cheirodontinae: Cheirodontini). **Neotropical Ichthyology**, 6: 663-678.
- Cabanne, G. S, F. M. d'Horta, E. H. R. Sari, F. R. Santos & C. Y Myiaki. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49: 760-773.
- Calcagnotto, D., S. A. Schaefer & R. DeSalle. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36:135-153.
- Camelier, P. 2010. **Aspectos taxonômicos e biogeográficos da ictiofauna de água doce de drenagens costeiras do Estado da Bahia, Brasil, com a descrição de seis espécies novas.** 223 f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Animal: Zoologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- Camelier, P. & A. M. Zanata. 2014. Biogeography of freshwater fishes from the Northeastern Mata Atlântica freshwater ecoregion: distribution, endemism, and area relationships. **Neotropical Ichthyology**, 12(4): 683–698.
- Castro, R. M. C., A. C. Ribeiro, R. C. Benine & A. L. A. Melo. 2003. *Lophiobrycon weitzmani*, a new genus and species of glandulocaudine fish (Characiformes: Characidae) from the rio Grande drainage, upper rio Paraná system, southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 1(1): 11-9.
- Che, Y. D. Wang, Y. Shi, D. Xiaohong, Z. Yongquan, N. Lo & W. Zongqing. A global molecular phylogeny and timescale of evolution for *Cryptocercus* woodroaches. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 98: 201-209.
- Dávalos, L. M., A. L. Cirranello, J. H. Geisler & N. B. Simmons, 2012. Understanding phylogenetic incongruence: lessons from phyllostomid bats. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, 87: 991-1024.

- Degnan, J. H. & N. A. Rosenberg. 2006. Discordance of Species Trees with Their Most Likely Gene Trees. **PLoS Genetics**, 5(2): 762-768.
- Drummond, A. J., M. A. Suchar, D. Xie & A. Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, 29: 1969-1973.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 32: 1792-1797.
- Edwards, S. V., L. Liu & D. K. Pearl. 2007. High-resolution species trees without concatenation. **PNAS**, 104(14): 5936-5941.
- Eigenmann, C. H. 1911. III. New characins in the collections of the Carnegie Museum. **Annals of the Carnegie Museum**, 8(1): 164-181.
- Eigenmann, C. H. 1914. Some results from studies of South American fishes, II. The Glandulocaudinae (a new subfamily of characid fishes with innate potentialities for sexual dimorphism). **Indiana University Studies**, 20: 32-35.
- Farias, I. P., G. Ortí & A. Meyer. 2000. Total Evidence: Molecules, Morphology, and the Phylogenetics of Cichlid Fishes. **Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)**, 288: 76-92.
- Fernández-Yépez, A. & J. R. Antón. 1966. **Estudio (análisis) ictiológico "Las Majaguas"**. Dirección de Obras Hidráulicas, Ministerio de Obras Públicas. República de Venezuela. 107p.
- Forest, F. 2009. Calibrating the Tree of Life: fossils, molecules and evolutionary timescales. **Annals of Botany**, 104: 789-794.
- Gadagkar, S. R., A. S. Rosenberg & S. Kumar. 2005. Inferring Species Phylogenies From Multiple Genes: Concatenated Sequence Tree Versus Consensus Gene Tree. **Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)**, 304B: 64-74.
- Gelman, A. & B. R. Donald. 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. **Statistical Science**, 457-472.
- Groth, J.G. & G. F. Barrowclough. 1999. Basal divergences of birds and the phylogenetic utility of nuclear RAG-1 gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 10: 377-390.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT., **Nucleic Acids Symposium Series**, 41: 95-98.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society**, 270: 313-322.
- Hilles, D. M. 1987. Molecular versus morphological approaches to Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 23-42.

- Hirschmann, A., Malabarba, L. R., Thomaz, A. T. & Fagundes, N. J. R. 2015. Riverine habitat specificity constrains dispersion in a Neotropical fish (Characidae) along Southern Brazilian drainages. **Zoologica Scripta**, 44(4): 374-382.
- Javonillo, R., L. R. Malabarba, S. H. Weitzman & J. R. Burns. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54:498-511.
- Kubatko, L. S. & J. H. Degnan. 2007. Inconsistency of Phylogenetic Estimates from Concatenated Data under Coalescence. **Systematic Biology**, 56(1): 17-24.
- Lanfear, R., B. Calcott, S.Y. W. Ho & S. Guindon. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. **Molecular Biology and Evolution**, 29: 1695-1701.
- Lavinia, P. D., P. Escalante, N. C. García, A. S. Barreira, N. Trujillo-Arias, P. L. Tubaro, K. Naoki, C. Y. Miyaki, F. R. Santos & D. A. Lijtmaer. 2015. Continental-scale analysis reveals deep diversification within the polytypic Red-crowned ant tanager (*Habia rubica*, cardinalidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 89: 182-193.
- Lima, F. C. T. & A. C. Ribeiro. 2011. Continental-Scale Tectonic Controls of Biogeography and Ecology. *In*: Albert, J. S. & R. E. Reis (Eds.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley, University of California Press, cap. 9, p. 145-184.
- Lovejoy, N. R. & B. B. Collette. 2001. Phylogenetic relationships of New World needlefishes (Teleostei: Belonidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. **Copeia**, 2001: 324-338.
- Lovejoy, N. R., K. Lester, W. G. R. Crampton, F. P. L. Marques & J. S. Albert. 2010. Phylogeny, biogeography, and electric signal evolution of Neotropical knifefishes of the genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54: 278-290.
- Malabarba, M. C. 1998. Phylogeny of fossil Characiformes and paleobiogeography of the Tremembé Formation, São Paulo, Brazil. *In*: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. S. Lucena & C. S. Lucena (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, p. 69-84.
- Mayden, R. L. 1988. Vicariance Biogeography, Parsimony, and Evolution in North American Freshwater Fishes. **Systematic Zoology**, 37(4): 329-355.
- Menezes, N. A. & S. H. Weitzman. 2009. Systematics of the Neotropical fish subfamily Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, 7(3): 295-370.

- Menezes, N. A. & S. H. Weitzman. 1990. Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the glandulocaudin fishes of Brazil and Paraguay. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, 103(2): 380-426.
- Menezes, N. A., S. H. Weitzman, O. T. Oyakawa, F. C. T. de Lima, R. M. C. Castro & M. J. Weitzman. 2007. **Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar de espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais**. São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 408p.
- Menezes, N. A., A. C. Ribeiro, S. H. Weitzman & R. A. Torres. 2008. Biogeography of the Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. **Zootaxa**, 1726: 33-48.
- Menezes, R. S. T., S. G. Brady, A. F. Carvalho, M. A. Del Lama & M. A. Costa. Molecular Phylogeny and Historical Biogeography of the Neotropical Swarm-Founding Social Wasp Genus *Synoeca* (Hymenoptera: Vespidae). **PLoS ONE** 10(3): e0119151. doi:10.1371/journal.pone.0119151.
- Miller, M. A., W. Pfeiffer & T. Schwartz. 2010. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. *In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, 1-8.
- Mirande, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes) from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, 8(3): 385-568.
- Myers, G. S. & Böhlke, J. E. 1956. The Xenurobryconini, a group of minute South American characid fishes with teeth outside the mouth. **Stanford Ichthyological Bulletin**, 7(2): 6-12.
- Oliveira, C., G. S. Avelino, K. T. Abe, T. C. Mariguela, R. C. Benine, G. Ortí, R. P. Vari & R. M. Corrêa e Castro. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, 2011: 1-25.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *In: Hillis D, C. Moritz & B, Mable (Eds.). Molecular Systematics*. Massachusetts, Sinauer Associates Inc., cap.7, 205-247.
- Pavan, A. C., F. M. Martins & J. S. Morgante. 2013. Evolutionary history of bulldog bats (genus *Noctilio*): recent diversification and the role of the Caribbean in Neotropical biogeography. **Biological Journal of the Linnean Society**, 108: 210-224.
- Rambaut, A. 2009. **FigTree, version 1.3.1**. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em 10 dez. 2015.

- Rambaut, A. & A. J. Drummond. 2009. **Tracer, version 1.5**. Disponível em: [http://beast.bio.ed.ac.uk/Main\\_Page](http://beast.bio.ed.ac.uk/Main_Page). Acesso em 16 dez. 2015.
- Ribeiro, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, 4(2): 225-246.
- Ribeiro, A. C., F. C. T. Lima & N. A. Menezes. 2016. Biogeografia dos Peixes de Água Doce da América do Sul. In: Carvalho, C. J. B. & E. A. B. Almeida (Eds.). **Biogeografia da América do Sul: análise de tempo, espaço e forma**. Rio de Janeiro, Roca, cap. 17, p. 245-258.
- Ribeiro, A. C., F. C. T. Lima, C. Ricomini & N. A. Menezes. 2006. Fishes of the Atlantic Rainforest of Boracéia: testimony of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, 17(2): 625-630.
- Rokas, A., B. L. Williamns, N. King & S. B. Carroll. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. **Nature**, 425: 798-80.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard & J. P. Hueslsbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, 61: 539-542.
- Roxo, F. F., J. S. Albert, G. S. C. Silva, C. H. Zawadzki, F. Foresti & C. Oliveira. 2014. Molecular Phylogeny and Biogeographic History of the Armored Neotropical Catfish Subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyrinae (Siluriformes: Loricariidae). **PLoS One**, 9(8): e105564. doi:10.1371/journal.pone.0105564.
- Roxo, F. F., C. H. Zawadzki, M. A. Alexandrou, G. J. Costa Silva, M. C. Chiachio & C. Oliveira. 2012. Evolutionary and biogeographic history of the subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Ecology and Evolution**, 2(10): 2438-2449.
- Serra, J. P., F. R. Carvalho & F. Langeani. 2007. Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo State: composition and biogeography. **Biota Neotropica**, 7(1): 81-86.
- Slowinski, J. B. & R. D. M. Page. 1999. How should species phylogenies be inferred from sequence data? **Systematic Biology**, 48(4): 814-825.
- Sotiaux, A., J. Enroth, S. Olsson, D. Quandt & A. Vanderpoorten. 2009. When morphology and molecules tell us different stories: a case-in-point with *Leptodon corsicus*, a new and unique endemic moss species from Corsica. **Journal of Bryology**, 31: 186-196
- Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, doi:10.1093/bioinformatics/btu033.

- Sullivan, J. P., J. G. Lundberg & M. Hardman. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using RAG-1 and RAG-2 nuclear sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 41: 636-662.
- Tagliacollo, V. A., M. J. Bernt, J. M. Craig, C. Oliveira & J. S. Albert. 2016. Model-based total evidence phylogeny of Neotropical electric knifefishes (Teleostei, Gymnotiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 23-59.
- Tagliacollo, V. A., R. Souza-Lima, R. C. Benine & C. Oliveira. 2012. Molecular phylogeny of Aphyocharacinae (Characiformes, Characidae) with morphological diagnoses for the subfamily and recognized genera. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 64(2): 297-307.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28(10): 2731-2739.
- Thomaz, A. T., D. Arcila, G. Ortí & L. R. Malabarba. 2015. Molecular phylogeny of the subfamily Stevardiinae Gill, 1858 (Characiformes: Characidae): classification and the evolution of reproductive traits. **BMC Evolutionary Biology**, 15: 1-25.
- Thomé, M. T., Zamudio, K. R., Giovanelli, J. G. R., Haddad, C. F. B., Baldissera, F. A. & Alexandrino, J. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 55: 1018-1031.
- Thompson, A.W., R. Betancur-R., H. López-Fernández, H., G. Ortí. 2014. A time-calibrated, multi-locus phylogeny of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalminidae) and a comparison of species tree methods, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.06.018>.
- Tonini, J., A. Moore, D. Stern, M. Shcheglovitova & G. Ortí. 2015. Concatenation and Species Tree Methods Exhibit Statistically Indistinguishable Accuracy under a Range of Simulated Conditions. **PLOS Currents Tree of Life**, doi: 10.1371/currents.tol.34260cc27551a527b124ec5f6334b6be.
- Tornow, M. A. & R. R. Skelton. 2012. A priori assumptions about characters as a cause of incongruence between molecular and morphological hypotheses of primate interrelationships. **Primates**, 53: 83-96.
- Xia, X. 2013. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 30: 1720-1728.
- Xia, X. & P. Lemey. 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. *In*: Lemey, P., M. Salemi, Vandamme, A. M. **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny**. Cambridge, University Press, p.615-630.

- Xia, X., Z. Xie, M. Salemi, L. Chen & Y. Wang. 2003. An index of substitution saturation and its application. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 26: 1-7.
- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last & P. D. N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 360: 1847-1857.
- Waters, J. M., R. M. Allibone & G. P. Wallis. Geological subsidence, river capture, and cladogenesis of galaxiid fish lineages in central New Zealand. **Biological Journal of the Linnean Society**, 88, 367-376.
- Weitzman, S. H. & S. V. Fink. 1985. Xenurobryconin phylogeny and putative pheromone pumps in glandulocaudine fishes (Teleostei: Characidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 421: 1-121.
- Weitzman, S. H. & N. A. Menezes. 1998. Relationships of the tribes and genera of the Glandulocaudinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) with a description of a new genus, *Chrysobrycon*. *In*: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, p. 171-192.
- Weitzman, S. H., N. A. Menezes & M. J. Weitzman. 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. *In*: Vanzolini, P. E. & W. R. Heyer (Eds.). **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, p. 379-427.
- Weitzman, S. H., N. A. Menezes, J. R. Burns & H-Georg Evers. 2005. Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, 3(3): 329-360.
- Willet, C. E, J J. Cherry & L. A. Steiner. 1997. Characterization and expression of the recombination activating genes (rag1 and rag2) of zebrafish. **Immunogenetics**, 45: 394-404.
- Weitzman, S. H. & M. J. Weitzman. 1982. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. *In*: Prance, G. T. (Ed.). **Biological diversification in the Tropics**. New York, Columbia University Press, p. 403-422.

## 7. Apêndice A

**Tabela 1.** Lista das espécies de Glandulocaudini utilizadas no presente estudo, com seus respectivos números de *vouchers* e tecido, além da localidade. Em relação aos *vouchers*/tecido, o mesmo tombo indica que o espécime foi depositado inteiro na coleção de tecido.

<b>Espécie</b>	<b>Vouchers</b>	<b>Tecido</b>	<b>Localidade</b>
<i>Lophobrycon weitzmani</i>	MNRJ 31626	Dados <i>GenBank</i>	Rio Grande, MG
<i>Lophobrycon weitzmani</i>	MNRJ 31664	Dados <i>GenBank</i>	Rio Grande, MG
<i>Glandulocauda caerulea</i>	MZUSP 117479-2		Rio Iguaçu, PR
<i>Glandulocauda melanopleura</i>	LBP 4507	LBP 24538	Alto Tietê, SP
<i>Glandulocauda melanopleura</i>	LBP 4507	LBP 24542	Alto Tietê, SP
<i>Mimagoniates inequalis</i>	LBP 3383	LBP 21275	Arroio dos Corrientes, RS
<i>Mimagoniates inequalis</i>	LBP 3383	LBP 21277	Arroio dos Corrientes, RS
<i>Mimagoniates lateralis</i>	LBP 70082		Itanhaém, SP
<i>Mimagoniates lateralis</i>	LBP 11450	LBP 52283	Itapoá, SC
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70049		Rio Pardo, BA
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70048		Rio Itaúnas, ES
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 10756	LBP 49795	Rio Paraíba do Sul, RJ
<i>Mimagoniates microlepis</i>	MZUSP 118711 (topótipo 7)		Rio Macacu, RJ
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 6817	LBP 33039	Itanhaém, SP
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 7545	LBP 36092	Ribeira de Iguape, SP
<i>Mimagoniates microlepis</i>	MZUSP 115093	LBP 70071	Alto Tietê, SP
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 7170	LBP 34359	Morretes, PR
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 7150	LBP34288	Matinhos, PR
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 3639	LBP 21685	Jaraguá do Sul, SC
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 13208	LBP 55228	Iguaçu, PR
<i>Mimagoniates rheocharis</i>	UFRGS 12896	UFRGS 911C	Rio Araranguá, SC
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70017		Prado, BA
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	MZUSP 112691	LBP 70019	Rio Patipe, BA

# CAPÍTULO 2

=====

**Filogeografia e história demográfica de *Mimagoniates microlepis* (Steindachner)  
(Characidae: Stevardiinae: Glandulocaudini), peixe de água doce endêmico e  
amplamente distribuído em rios e riachos da Mata Atlântica, com comentários  
sobre a taxonomia e conservação da espécie**

## Resumo

*Mimagoniates* é o gênero mais representativo de Glandulocaudini e, assim como *Lophiobrycon* e *Glandulocauda*, tem, predominantemente, distribuição restrita, com elevado grau de endemismo reconhecido. No entanto, difere destes, típicos de regiões altas do escudo cristalino brasileiro, por ocorrer em áreas de planície, especialmente na região costeira do leste do Brasil. A grande exceção é *M. microlepis* que, ao contrário de todos os Glandulocaudini, está amplamente distribuída em rios e riachos da vertente leste da Serra do Mar, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, e, diferente das congêneres, também ocorre em bacias que drenam terras altas do escudo brasileiro. A distribuição ampla e disjunta de *M. microlepis*, aliada à reconhecida variação clinal de caracteres morfológicos para algumas das suas populações, impulsionaram este trabalho, que teve como objetivo realizar estudos mais aprofundados em nível populacional para melhor compreensão da história evolutiva da espécie. No presente estudo, foram, portanto, utilizadas fontes de dados e abordagens metodológicas distintas, incluindo análises filogenéticas, filogeográficas e de história demográfica baseadas em dados moleculares, além de um estudo morfológico comparativo de *M. microlepis*. Para tanto, foram obtidas e analisadas sequências de dois genes mitocondriais (16S rRNA e COI) de espécimes de *M. microlepis* de toda a distribuição conhecida da espécie, incluindo localidade tipo, além do grupo externo. Também foram obtidas sequências do gene nuclear RAG2, que, apesar de um número menor de amostras, incluiu material dos principais pontos de distribuição da espécie. Análises moleculares baseadas no mtDNA (filogenéticas e filogeográficas) indicam uma forte estruturação ao longo da distribuição de *M. microlepis*, com distinção clara de quatro haplogrupos, que também foram recuperados como linhagens independentes pelas análises realizadas. Estes haplogrupos foram definidos no sentido nortesul como (1) Haplogrupo 1, ocorrente em drenagens costeiras da Bahia e Espírito Santo; (2) Haplogrupo 2, em bacias costeiras do Rio de Janeiro, incluindo localidade tipo, e São Paulo; (3) Haplogrupo 3, nas bacias dos rios Tietê (afluente do rio Paraná) e Ribeira de Iguape, além de drenagens costeiras do Paraná; e (4) Haplogrupo 4, ocorrente em bacias costeiras de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além das bacias dos rios Iguazu e Tibagi (afluentes do Paraná). As análises de demografia histórica fornecem indícios de que as populações mais antigas de *M. microlepis* tenham se estabelecido em drenagens mais ao sul, indicando que a origem da diversificação da espécie tenha se dado nestas drenagens, com posterior expansão populacional no sentido norte. O não compartilhamento de haplótipos entre os haplogrupos de *M. microlepis* apontam para três quebras filogeográficas na Mata Atlântica, que concordam, em parte, com

algumas já propostas para a biota terrestre. As análises baseadas no mtDNA (1059 pb) também indicaram que a espécie *M. microlepis* não é monofilética, em virtude da relação mais estreita do HAP4 com *M. lateralis*. Por outro lado, as análises baseadas no gene nuclear RAG2 (770 pb) e na árvore de espécies indicaram o contrário e recuperam *M. microlepis* como um clado, de maneira que o parafiletismo do mtDNA sugere a ocorrência de introgressão mitocondrial entre esta população específica e *M. lateralis*. Com os resultados obtidos a partir das análises morfológicas também não foi possível separar os haplogrupos propostos pelo mtDNA em espécies distintas e o nome *M. microlepis* foi mantido para as diferentes populações alopátricas. No entanto, apesar de não ter sido proposta nenhuma alteração na taxonomia de *M. microlepis*, em função das divergências genéticas acentuadas, sugere-se que, para fins de conservação, as linhagens evolutivas distintas sejam levadas em consideração.

## 1. Introdução

A filogeografia é uma ciência relativamente recente que tem suas raízes nos campos da biogeografia histórica e genética de populações (Bermingham & Moritz, 1998), tendo como foco o estudo dos princípios e processos, históricos e contemporâneos, que influenciaram a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, em especial dentro e/ou entre espécies proximamente relacionadas (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000, 2009). O aprimoramento e ampla utilização das técnicas de genética molecular modificaram a forma como algumas questões eram abordadas nos estudos de biogeografia, de maneira que a filogeografia passou a ser vista como uma ferramenta capaz de lidar, de maneira eficiente, com questões anteriormente intratáveis (Riddle *et al.*, 2008). As forças evolutivas (*e.g.*, mutação, deriva genética, fluxo gênico) e os eventos demográficos (*e.g.*, expansão ou declínio populacional, extinção, migração) deixam marcas na história genealógica das populações e a filogeografia possibilita decifrar estas marcas e entender como estes fatores moldaram a distribuição atual da variabilidade genética em uma espécie (Cunha & Solé-Cava, 2012). Assim, este tipo de abordagem tem sido amplamente utilizado para descrever eventos históricos, tais como a fragmentação de habitats ou expansão da área de distribuição de espécies e populações, eventos de migração, vicariância ou extinção de linhagens gênicas, assim como outros processos que afetam a estrutura das populações ao longo do tempo (Hardy *et al.*, 2002; Martins & Domingues, 2011). Aqui, é importante ressaltar que, apesar da filogeografia ser comumente utilizada como ferramenta para esclarecer padrões históricos e evolutivos entre populações, estudos filogeográficos têm sido cada vez mais utilizados para auxiliar o reconhecimento e estabelecimento de limites de

espécies e também a definição de unidades de conservação e manejo (Vázquez-Domínguez, 2007; Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009), de maneira que sua influência nas áreas da taxonomia e biologia da conservação tem ganhado muito destaque nos últimos anos (*e.g.*, Thomé *et al.*, 2010; Brunes *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2016).

A grande maioria das espécies de peixes de água doce, especialmente aquelas da divisão primária, é incapaz de transpor porções de terra ou tolerar níveis de salinidade como da água do mar. Sendo assim, o oceano e as barreiras terrestres são capazes de isolar populações de peixes dentro de uma determinada bacia hidrográfica após sua formação (Vari, 1988). Justamente por estarem restritos a corpos d'água limitados por estas barreiras, os peixes de água doce constituem um grupo interessante para a investigação de eventos biogeográficos (Weitzman & Weitzman, 1982; Vari, 1988). Em virtude desta desconexão atual entre as bacias hidrográficas, é esperado também que populações de espécies de peixes de corpos d'água distintos e independentes sejam geneticamente estruturadas (Avice, 2000; Waters *et al.*, 2007). Já que há dependência direta de conexões entre as bacias hidrográficas para que os peixes de água doce aumentem sua dispersão, é esperada uma forte relação entre a história das bacias e sua ictiofauna (Hischmann *et al.*, 2015). Assim, para os peixes de água doce, a filogeografia é integralmente relacionada à paisagem e a história da paisagem (Avice, 2009), o que torna o grupo um excelente modelo para este tipo de estudo. No entanto, apesar de os peixes de água doce oferecerem uma excelente oportunidade para a proposição de hipóteses biogeográficas e, mais especificamente, de estudos filogeográficos, a biogeografia e, em especial, a filogeografia da ictiofauna de água doce Neotropical é ainda pouco conhecida. Em relação às análises filogeográficas propriamente ditas, a grande maioria dos estudos é realizada em regiões temperadas, no Hemisfério Norte, principalmente nos Estados Unidos e Europa (Beheregary, 2008; Hickerson *et al.*, 2010). Este cenário, entretanto, vem mudando paulatinamente e a publicação de trabalhos de filogeografia que utilizam peixes de água doce neotropicais como modelo de estudo tem se tornado cada vez mais comum (*e.g.*, Sivasundar *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2004; Renno *et al.*, 2006; Hubert *et al.*, 2007; Vergara *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Piggot *et al.*, 2011; Borba *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013). No que diz respeito à ictiofauna de água doce da Mata Atlântica (MA), segunda maior formação florestal da Região Neotropical, no entanto, o cenário não tem mudado muito nos últimos anos e pouquíssimos estudos filogeográficos foram realizados.

A MA estendia-se, originalmente, ao longo da região costeira do Brasil, desde o Estado do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, na fronteira com a Argentina e o Paraguai (Oliveira-Filho & Fontes, 2000). Atualmente, este domínio detém menos de 10% da sua

cobertura florestal primária e estima-se que apenas 2 a 5% das terras originalmente localizadas na MA permanecem inalteradas (Menezes *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2015). No entanto, mesmo após perder mais de 90% da sua área original, a MA ainda está entre os cinco principais *hotspots* de biodiversidade do mundo, sendo reconhecida pela sua megadiversidade e pelos altos índices de endemismo (Myers *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2015). Apesar de intrigar, há tempos, os biólogos interessados em evolução, os processos relacionados à formação da megadiversidade da MA ainda são controversos e pouco estudados, principalmente quando comparados com outras áreas, como a região Amazônica, por exemplo (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Segundo Batalha-Filho & Miyaki (2011), o entendimento da história evolutiva da MA não é uma tarefa simples e, talvez, apenas com a realização e compilação de estudos filogeográficos de táxons distintos, será possível entender a dinâmica de diversificação que gerou a megadiversidade neste domínio.

A ictiofauna dos rios e riachos que drenam a MA é reconhecida pelo alto grau de endemismo e o padrão de distribuição das espécies é o resultado de milhões de anos de evolução da paisagem (Menezes *et al.*, 2007). As bacias que drenam este domínio ocupam a parte leste do escudo cristalino brasileiro, uma área de topografia complexa, que foi moldada pela atividade tectônica ocorrida no Terciário e mudanças no nível do mar no Quaternário (Ribeiro, 2006). Assim, os eventos que provavelmente são responsáveis pelos atuais padrões de distribuição de peixes na MA, devem ser atribuídos tanto a um passado remoto, talvez de idade cretácea, quanto a eventos mais recentes, datados do Terciário e Quaternário, com destaque para atividades neotectônicas nas áreas de planalto e expansões/retrações das planícies costeiras, decorrentes das flutuações do nível do mar (Ribeiro, 2006; Menezes *et al.*, 2007). A respeito dos estudos filogeográficos já realizados com táxons da MA, é importante salientar que a esmagadora maioria destes teve como foco plantas (*e.g.*, Pinheiro *et al.*, 2011) ou animais terrestres, tais como insetos (*e.g.*, Cardoso *et al.*, 2015), anfíbios adultos (*e.g.*, Tonini *et al.*, 2013), répteis (*e.g.*, Grazziotin *et al.*, 2006), aves (*e.g.*, Cabanne *et al.*, 2013) e mamíferos (*e.g.*, Martins *et al.*, 2011), de maneira que, como já mencionado, os trabalhos envolvendo a biota aquática, ocorrente nos rios que drenam a MA, são escassos ou ausentes com relação a alguns táxons. Turchetto-Zolet *et al.* (2013), por exemplo, fizeram uma revisão dos trabalhos de filogeografia realizados com táxons ocorrentes na América do Sul até aquele momento e todos os estudos que incluíram peixes de água doce (citados pelos autores) envolveram apenas a fauna amazônica. No que diz respeito aos táxons endêmicos de rios (ou de trechos deles) que drenam a MA, o número de trabalhos desenvolvidos é ainda menor e a maioria destes estudos

foi feita com grupos de distribuição restrita, especialmente às drenagens da região Sul e Sudeste do Brasil (e.g., Hirschmann *et al.*, 2015; Thomaz *et al.*, 2015a; Lima *et al.*, 2016).

*Mimagoniates* Regan é um gênero que inclui espécies de peixes de água doce da família Characidae, tribo Glandulocaudini *sensu* Thomaz *et al.* (2015b), com sete espécies reconhecidas: *M. barberi* Regan, *M. inequalis* (Eigenmann), *M. lateralis* (Nichols), *M. microlepis* (Steindachner), *M. pulcher* Menezes & Weitzman, *M. rheocharis* Menezes & Weitzman e *M. sylvicola* Menezes & Weitzman. Assim como no caso de *Lophiobrycon* Castro, Ribeiro, Benine & Melo e *Glandulocauda* Eigenmann, outros dois gêneros de Glandulocaudini, as espécies de *Mimagoniates* têm distribuição predominantemente restrita, com um alto grau de endemismo reconhecido (Menezes & Weitzman, 2009). No entanto, contrariamente aos demais, típicos de regiões de elevadas altitudes do escudo cristalino brasileiro, o gênero *Mimagoniates* ocorre, no geral, em áreas baixas de planície litorânea, em drenagens costeiras desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Weitzman *et al.*, 1988), no domínio MA. Neste contexto, *M. microlepis* pode ser considerada “uma grande exceção”, por peculiaridades que a difere tanto dos demais glandulocaudíneos quanto das suas congêneres. A espécie, que foi descrita da bacia do rio Macacu, drenagem costeira do Rio de Janeiro, representa uma exceção em Glandulocaudini, visto que, diferentemente de todos os outros membros desta tribo, não apresenta distribuição restrita, ocorrendo ao longo de quase toda extensão da MA, em rios e riachos desde o Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul; e representa também uma exceção dentro do gênero, pois não tem distribuição restrita às áreas de planície litorânea, ocorrendo também em regiões mais altas, em áreas adjacentes de planalto, no escudo cristalino brasileiro, drenadas pela bacia do alto Paraná (Menezes *et al.*, 2008; Menezes & Weitzman, 2009).

Ao compararem amostras de *M. microlepis* de algumas localidades ao longo de sua distribuição em bacias costeiras e também de tributários do rio Iguçu (bacia do alto Paraná), Menezes & Weitzman (2009) detectaram variação clinal de alguns caracteres morfológicos na espécie (e.g., número de raios ramificados na anal, número de escamas perfuradas na linha lateral). Naquela ocasião, os autores concluíram que todas as amostras pertenceriam a *M. microlepis*, uma espécie que seria, portanto, amplamente distribuída e representada por populações alopátricas, mas salientaram a necessidade de estudos mais detalhados, principalmente em nível populacional e com a utilização de ferramentas moleculares, para refutar ou corroborar tal hipótese, bem como para melhor entender a história evolutiva da espécie. Esta abordagem já havia sido utilizada anteriormente por Menezes *et al.* (2008) para discutir, neste caso, o padrão de distribuição da espécie em drenagens costeiras dos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e também no Iguçu. No entanto, como salientado pelos

próprios autores na ocasião, apenas uma parte da distribuição de *M. microlepis* foi contemplada e análises adicionais ainda se faziam necessárias. Posteriormente, Torres & Ribeiro (2009) também utilizaram ferramentas moleculares para discutir a distribuição alopatrica de *M. microlepis*, mas com as mesmas amostras utilizadas por Menezes *et al.* (2008). Assim, o problema de amostragem não foi resolvido e questões envolvendo a história evolutiva da espécie se mantiveram em aberto, especialmente porque o estudo dos dois últimos autores não incluiu amostras da localidade tipo, de localidades ao norte de São Paulo ou ao sul de Santa Catarina, nem do rio Tibagi, outro afluente da bacia do rio Paraná, no escudo cristalino brasileiro, de onde a espécie também foi registrada anos antes por Sant'Anna *et al.* (2006).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo principal realizar uma análise filogeográfica ampla de *Mimagoniates microlepis* a partir de amostras de toda a sua distribuição, incluindo a localidade tipo, para verificar se existe divergência nas linhagens gênicas das populações, bem como inferir sobre os fatores históricos/contemporâneos que puderam ou podem influenciar a distribuição destas linhagens. Buscou-se também associar dados moleculares e morfológicos para testar a hipótese de Menezes & Weitzman (2009) de que, apesar variação clinal detectada com relação a alguns caracteres, *M. microlepis* representa uma única espécie. Além disso, por se tratar de uma espécie endêmica da Mata Atlântica, onde está amplamente distribuída, os resultados obtidos no presente estudo poderão também auxiliar o entendimento mais completo da história deste domínio, cuja paisagem inclui tanto a floresta quanto as bacias hidrográficas.

## **2. Material & Métodos**

### **2.1. Análises moleculares**

#### **2.1.1 Amostragem taxonômica**

Amostras de tecido (músculo, brânquias e/ou nadadeiras) de *Mimagoniates microlepis* foram obtidas por meio de coletas, realizadas no período entre 2012 e 2015, e doações das seguintes instituições: Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* de Botucatu, Museu de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ), Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Núcleo de Pesquisa Aplicada em Aquicultura e Pesca do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense de

Araquari (NUPA), Universidade Estadual de Maringá/Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura (Nupélia) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A maior parte do material coletado ou doado (tanto *vouchers*, quanto tecido) foi tombada nas coleções ictiológicas do LBP e do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Além do material de *M. microlepis*, também foram coletadas/obtidas amostras/sequências de sete espécies de Glandulocaudini; *Glandulocauda caerulea* Menezes & Weitzman, *G. melanopleura* (Ellis), *Lophobrycon weitzmani* Castro, Ribeiro, Benine & Melo, *Mimagoniates inequalis*, *M. lateralis*, *M. rheocharis* e *M. sylvicola* (Apêndice A, Tabela 1). Antes das análises moleculares propriamente ditas, os *vouchers* de todas as amostras foram analisados e identificados em nível específico, com base nos caracteres diagnósticos de morfologia externa apresentados na literatura (*e.g.*, Menezes & Weitzman, 1990, 2009) e, no caso de *M. microlepis*, revisados neste trabalho.

Ainda em relação à amostragem taxonômica, é importante ressaltar que, em algumas análises, foram também incluídas sequências gênicas de espécies de Characidae não pertencentes a Glandulocaudini. As justificativas para estas inclusões e a maneira como estas sequências foram obtidas serão devidamente esclarecidas quando necessário.

### **2.1.2. Considerações sobre os genes utilizados**

Características peculiares, tais como herança uniparental, geralmente materna, ausência de recombinação significativa e evolução rápida (cerca de 5 a 10 vezes mais rápido que o genoma nuclear), fizeram do DNA mitocondrial (mtDNA) uma ferramenta interessante para o estudo das relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações (Calcagnotto, 2012). Estas idiosincrasias também são responsáveis pela escolha do mtDNA como marcador particularmente apropriado para estudos filogeográficos de animais, pois elas os tornam sensíveis à diferenciação populacional e capazes de recuperar histórias recentes (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000, 2004). No presente estudo, foram utilizados dois genes mitocondriais: 16S rRNA e Citocromo Oxidase I (COI). Apesar do 16S rRNA ser um gene relativamente conservado, apresenta variação suficiente em alguns táxons, o que o torna útil para estudos em nível populacional (Palumbi, 1996), como é o caso das análises filogeográficas. Além do COI ser um dos genes mitocondriais mais utilizados em análises filogenéticas envolvendo variados níveis taxonômicos de grupos animais (Hebert *et al.*, 2003), apresenta evolução suficientemente rápida, que permite não apenas a identificação de espécies relacionadas, como também de grupos filogeográficos dentro de uma única espécie (Cox & Hebert 2001; Wares & Cunningham 2001; Hebert *et al.*, 2003). Outra justificativa para a inclusão do COI no presente estudo é que

este é o gene utilizado através do método de *DNA barcoding* para identificação molecular de espécies de animais (Hebert *et al.*, 2003). Apesar das ressalvas associadas a este método (que serão discutidas adiante), ele tem se mostrado uma ferramenta muito útil para detectar espécies crípticas/complexos de espécies (Marques *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2016), fornecer evidências de unidades evolutivas independentes ou unidades taxonômicas operacionais (Costa-Silva *et al.*, 2015) e, muitas vezes, tem sido um excelente ponto de partida para trabalhos de taxonomia tradicional (Kekkone & Hebert, 2014). No presente estudo, também foram utilizadas sequências de um marcador nuclear, o gene Ativador de Recombinação 2 (RAG2). Como será visto adiante, no entanto, por uma questão de amostragem, este marcador foi utilizado em um número menor de análises. As informações de quantos e quais marcadores foram utilizados para cada uma das análises será devidamente fornecida quando necessário. Características gerais sobre os genes utilizados são também fornecidas no Capítulo 1 desta tese.

### **2.1.3. Extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento**

Os procedimentos laboratoriais para extração, amplificação e sequenciamento foram os mesmos daqueles apresentados no Capítulo 1, onde poderão ser consultados.

### **2.1.4. Obtenção das sequências consenso, alinhamentos e matrizes de dados**

As sequências consenso para cada gene foram obtidas e alinhadas seguindo os mesmos procedimentos apresentados no Capítulo 1 desta tese, onde poderão ser consultados. Neste capítulo, foram geradas quatro matrizes de dados, uma para cada um dos genes individualmente (16S, COI e RAG2) e uma apenas para os genes mitocondriais, que, por estarem ligados, foram concatenados e analisados como um único *locus*. Para a concatenação, só foram incluídos indivíduos que tiveram ambos os genes amplificados e sequenciados. A matriz utilizada em cada uma das análises feita é indicada quando necessário.

### **2.1.5. Análises filogenéticas**

Para testar o monofiletismo de *Mimagoniates microlepis*, inferir o grau de estruturação genética e avaliar suas relações de parentesco, foram feitas duas análises de reconstrução filogenética utilizando os métodos probabilísticos de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV). Cada método foi aplicado individualmente nas matrizes geradas (mitocondrial concatenada e nuclear).

O grupo interno inclui diferentes populações de *M. microlepis* ao longo da sua distribuição geográfica (cujas sequências foram obtidas no presente estudo) e o grupo externo é formado por outras sete espécies de Glandulocaudini (*Lophiobrycon weitzmani*, *Glandulocauda caerulea*, *G. melanopleura*, *Mimagoniates inequalis*, *M. lateralis*, *M. rheocharis* e *M. sylvicola*), além de três espécies de Characiformes não pertencentes a esta tribo (*Bryconops caudomaculatus* (Günther), *Cheirodon ibicuihensis* Eigenmann e *Spintherobolus leptoura* Weitzman & Malabarba). Tanto *C. ibicuihensis* quanto *S. leptoura* pertencem à Characidae. A inclusão de *Bryconops* Kner nesta família, entretanto, é controversa, pois, apesar de filogenias baseadas em dados morfológicos sugerirem que este se trata de gênero basal em Characidae (e.g., Mirande, 2010), hipóteses baseadas em dados moleculares alocam *Bryconops* na família Iguanodectidae (e.g., Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015b). Independente da família a qual pertence, sequências de *B. caudomaculatus* foram utilizadas para o enraizamento das topologias, já que este é o táxon do presente conjunto de dados mais distante de *M. microlepis*. No caso do grupo externo, a maioria das sequências também foi obtida no presente estudo, com exceção das de *B. caudomaculatus*, *C. ibicuihensis*, *L. weitzmani* e *S. leptoura*, que foram retiradas do *GenBank*, e correspondem àquelas depositadas por Oliveira *et al.* (2011) e/ou Thomaz *et al.* (2015b), que realizaram análises filogenéticas (com base em dados moleculares) da família Characidae e subfamília Stevardiinae (Characidae), respectivamente.

Antes da análise filogenética, estimou-se para cada gene separadamente o Índice de Saturação de Substituição (I<sub>SS</sub>), como descrito por Xia *et al.* (2003) e Xia & Lemey (2009) e detalhado no Capítulo 1 desta tese. O melhor modelo de evolução nucleotídica também foi estimado de cada gene individualmente no programa MrModeltest v. 2.2 (Nylander, 2004), sob o critério de informação de Akaike (AIC). As matrizes de dados geradas (16S, COI, mitocondrial concatenada e RAG2) também foram analisadas no MEGA v. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) para obtenção do número de sítios conservados (C), variáveis (V) e informativos (Pi).

A análise de MV foi feita através do programa RAxML-HPC2 v.8.2.4 (Stamatakis, 2014). Árvores randômicas de partida foram geradas para cada busca independente e todos os outros parâmetros foram estabelecidos em valores padrão. Todas as análises de MV foram conduzidas sob o modelo GTRCAT e a robustez topológica foi investigada através do teste estatístico de *bootstrap* com 1.000 pseudoréplicas. A análise de IB foi realizada no MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012), sob o modelo GTR+I+G para a matriz mitocondrial e SYM+G para a matriz nuclear, conforme estimado pelo MrModeltest, partindo de uma árvore randômica para as buscas da *Monte Carlo Markov chain* (MCMC). A análise em si consistiu de duas corridas simultâneas com 20 milhões de gerações cada, sendo cada uma com quatro MCMC e uma

árvore foi salva a cada 500 gerações. Foram excluídas as 4 mil árvores iniciais (i.e., *burn-in* de 10%) e os valores de probabilidade posterior foram estimados com as árvores restantes. Na versão do MrBayes utilizada no presente estudo, é possível checar, no próprio programa, o desempenho da MCMC e a convergência entre as corridas, através dos valores de *Effective Sample Size* (ESS) e *Potencial Scale Reduction Factor* (PSRF). Valores acima de 200 e próximos a 1 no primeiro e segundo caso, respectivamente, indicam bom desempenho da análise. As análises filogenéticas foram implementadas no portal CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010) e as topologias geradas foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.3.1 (Rambaut, 2009) e MEGA.

### 2.1.6. Árvore de espécies (*Species Tree*)

Com o intuito de combinar os genes analisados em uma única árvore e acomodar as inconsistências entre árvores de genes e árvores de espécies (Degnan & Rosenberg, 2006; Kubakto & Degnan, 2007), foi utilizado o método Bayesiano coalescente *Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data* (\*BEAST; Heled & Drummond, 2010) no programa BEAST v. 1.8.0 (Drummond *et al.*, 2012). A abordagem implementada no \*BEAST assume que árvores de genes estão “incorporadas” dentro da árvore de espécies segundo o processo estocástico assumido pela teoria coalescente (Degnan & Rosenberg, 2009). O banco de dados utilizado para a inferência da árvore de espécies contou com os três genes, sendo que o 16S e o COI foram concatenados em uma matriz mitocondrial. Nesta análise, só foram incluídas nas matrizes (mitocondrial concatenada e nuclear) sequências de *Mimagoniates microlepis* e *M. lateralis*. Esta opção metodológica baseou-se nas incongruências obtidas entre os resultados das análises filogenéticas mitocondrial e nuclear. Assim, *M. lateralis* e cada haplogrupo de *M. microlepis* foi atribuído como uma “espécie” a ser validada na estimativa. Antes de aplicar a análise coalescente de árvores de espécie, a matriz do RAG2 foi analisada através do programa DnaSP v.5.10 (Librado & Rozas, 2009) sob o algoritmo PHASE (Stephens *et al.*, 2001), mas nenhum sítio heterozigoto foi encontrado. O arquivo de entrada do programa \*BEAST foi gerado no BEAUTi v. 1.8.0., considerando-se duas partições, mitocondrial e RAG2, e os seguintes parâmetros: modelos de substituição HKY+I+G (mitocondrial) e HKI (RAG2), estimados no MrModeltest com o AIC, *priors Yule Process* (modelo de especiação) e *Piecewise linear & constant root* e uma árvore UPGMA de partida. Foram realizadas duas corridas independentes, cada uma com 100 milhões de gerações de MCMC, com parâmetros sendo amostrados a cada 500 gerações e resultando em 20.001 árvores salvas. Em função do elevado tempo computacional, a análise no BEAST foi implementada no portal CIPRES. O desempenho das

corridas e seus respectivos parâmetros foram analisados no Tracer v. 1.5.1 (Rambaut & Drummond, 2009), onde foram checados os valores de ESS e o *burn-in*. Foram excluídas, então, as 2 mil árvores iniciais (i.e., *burn-in* de 10%) e os valores de probabilidade posterior foram estimados com as árvores restantes. O processo de *burn-in* e a combinação das corridas independentes foram realizados no LogCombiner v. 1.8.0. A árvore de espécies final foi gerada no TreeAnnotator v. 1.8.0 e, posteriormente, visualizada no FigTree para obtenção dos valores de probabilidade posterior. O programa DensiTree v. 2.2.1 (Bouckaert & Heled, 2014) foi utilizado para visualização de todas as árvores geradas após o *burn-in* e para detectar possíveis incongruências entre elas. O arquivo final gerado pelo DensiTree corresponde a um diagrama, onde todas as árvores geradas estão sobrepostas. Neste diagrama, que tem sido chamado na literatura de *cloudogram* (e.g., McCormack *et al.*, 2010, 2012; Chaves & Smith, 2011; Pabijan *et al.*, 2012; Lavinia *et al.*, 2015), ramos coincidentes se mostram mais fortemente coloridos, representando visualmente os clados bem suportados.

#### **2.1.7. Análise de *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC)**

Proposto inicialmente por Pons *et al.* (2006) e Fontaneto *et al.* (2007), o *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC) tem se tornado um dos métodos mais populares para delimitação de espécies, Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) e/ou Unidades Evolutivas Independentes (UEIs) (Reid & Carstens, 2012; Fujisawa & Barraclough, 2013; Costa-Silva *et al.*, 2015). Este método, que foi especificamente desenvolvido e tem sido aplicado em dados moleculares de um único *locus*, não requer qualquer informação prévia sobre as espécies analisadas, tornando-se particularmente promissor para análises exploratórias em grupos com incertezas taxonômicas (Talavera *et al.*, 2013) e para estudos de avaliação da biodiversidade (Roxo *et al.*, 2015). O GMYC combina modelos de diversificação entre espécies (modelos *Yule*) com a teoria da coalescência para determinar o ponto de transição entre processos evolutivos em nível de espécie (especiação e extinção) e população (coalescência) (Pons *et al.*, 2006). O método se baseia em uma árvore ultramétrica, estimada a partir de dados de sequências de DNA, e considera que os pontos de ramificação desta árvore correspondam ou a um evento de divergência entre espécies ou a um evento de coalescência entre linhagens de uma mesma espécie (Reid & Carstens, 2012; Fujisawa & Barraclough, 2013; Roxo *et al.*, 2015). Assim, nos resultados desta análise, é possível identificar graficamente, na topologia gerada a partir dos dados de interesse, a fronteira entre divergências intra e interespecíficas.

No presente estudo, o GMYC foi implementado para avaliar se as diferentes populações alopátricas de *Mimagoniates microlepis* representam ou não a mesma espécie do ponto de vista

molecular e também para definir UTOs ao longo da distribuição destas espécies. A definição destas unidades foi crucial para nortear as análises morfológicas realizadas posteriormente.

Uma das premissas do GMYC, que está associada diretamente à qualidade e robustez da análise, é a utilização de sequências de múltiplas espécies e do maior número de populações possível (Fujisawa & Barraclough, 2013; Costa-Silva *et al.*, 2015). Entre as matrizes de dados geradas no presente estudo, aquela que melhor atende à segunda premissa é a do COI, que foi a utilizada. Com o objetivo de aumentar o número de espécies amostradas e atender, assim, a primeira premissa do método, as sequências do COI obtidas no presente estudo foram inseridas na matriz de Thomaz *et al.* (2015b) deste gene, cujos dados foram extraídos do *GenBank*. Aqui, é importante ressaltar que, para não comprometer a segunda premissa do método, só foram utilizados os táxons desta matriz com ocorrência em mais de uma localidade (equivalente a populações distintas). Uma vez montada e alinhada a matriz final, a árvore ultramétrica foi estimada através do método Bayesiano no programa BEAST v. 1.7.2. (Drummond & Rambaut, 2007), utilizando os seguintes parâmetros: modelos GTR+I+G de evolução nucleotídica (estimado no programa MrModeltest), *Lognormal Relaxed Molecular Clock* e o *Birth-Death Processes* como *prior*. Uma árvore randômica de partida foi utilizada nas buscas da MCMC. Foram realizadas duas corridas simultâneas com 150 milhões de gerações cada e as árvores foram salvas a cada 25 mil gerações. Em função do elevado tempo computacional, a análise do BEAST foi implementada no portal CIPRES. O desempenho das corridas e seus respectivos parâmetros foram analisados no Tracer. Todas as topologias abaixo da assíntota (15 mil gerações) foram descartadas como parte do processo de *burn-in* e as árvores remanescentes foram usadas para construir a topologia final (*Maximum Clade Credibility Topology*) no TreeAnnotator v. 1.7.2. Uma vez gerada a árvore de entrada (ultramétrica), a análise GMYC propriamente dita foi realizada por meio do programa R v. 3.0.0 (R Development Core Team, 2013) com o pacote *Species Limits by Threshold Statistics* (SPLIT) (<http://r-forge.r-project.org/projects/splits>), sob a opção *Single Thresold*, utilizando os parâmetros do *default*.

#### **2.1.8. Análise de *DNA barcoding***

Hebert *et al.* (2003) propuseram o *DNA barcoding* como método para identificação molecular de espécies. Este método utiliza um pequeno fragmento (~ 650 pb) padronizado de DNA do gene mitocondrial COI (no caso de animais) para identificar espécies, tendo como base a comparação entre as suas sequências. Geralmente, os pesquisadores que utilizam a ferramenta de *DNA barcoding* estabelecem uma divergência genética de 2% como valor limite para delimitação de espécies (*e.g.*, Hubert *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2009; Carvalho *et*

*al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011). Este limite é baseado na distribuição de valores de distância genética Kimura-2 parâmetros (K2P) intra e interespecífica de, aproximadamente, 172.000 espécies sequenciadas, incluindo 9.502 peixes (Pereira *et al.*, 2013).

No presente estudo, os valores de divergência entre as sequências gênicas dos grupos reconhecidos pelo GMYC foram calculados sob o modelo K2P no programa MEGA para avaliar a congruência entre os resultados obtidos por esta análise e o método de *DNA barcoding* no reconhecimento molecular de espécies. Neste caso, também foi utilizada apenas a matriz de dados do COI.

### **2.1.9. Análises filogeográficas**

As análises filogeográficas propriamente ditas foram realizadas, levando em consideração apenas o gene mitocondrial COI pelo fato deste ter sido sequenciado no maior número de indivíduos, de bacias hidrográficas e de localidades (i.e., pontos de coleta) distintas. Assim, nestas análises, foram utilizadas amostras de *Mimagoniates microlepis* de todos os haplogrupos propostos através da análise filogenética mitocondrial e de toda a distribuição da espécie, incluindo sua localidade tipo.

#### **2.1.9.1. Estimativas de estrutura filogeográfica**

As redes de haplótipos foram construídas através do método de *Median-joining network* (Bandelt *et al.*, 1999) implementado no programa NETWORK v. 5.0.0.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>). O arquivo de entrada deste programa foi gerado no DnaSP v. 5.10 (Librado & Rozas, 2009) a partir da matriz do COI já alinhada e contendo sequências de *Mimagoniates microlepis* e *M. lateralis*. Para verificar o nível de estruturação genética e de variação populacional entre os haplogrupos e localidades analisadas, foi implementada a análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) com três níveis hierárquicos no programa Arlequin v. 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Os níveis hierárquicos de diferenciação populacional calculados na AMOVA foram: (1) entre grupos ( $F_{CT}$ ); (2) entre populações dentro de grupos ( $F_{ST}$ ); e (3) dentro das populações ( $F_{SC}$ ). Neste caso, os grupos são representados por cada um dos haplogrupos e as populações amostradas nos locais de coleta. Com o intuito de avaliar o grau de diferenciação e estruturação das populações, a AMOVA também foi aplicada nos haplogrupos individualmente, nos quais foram obtidos valores específicos de  $F_{ST}$ . A significância dos testes foi obtida com mil permutações. Nestas análises, foram utilizadas somente localidades que possuíam no mínimo dois indivíduos amostrados.

### 2.1.9.2. Estatísticas sumárias e análises de demografia histórica

A diversidade nucleotídica por sítio ( $\pi$ ), o número de haplótipos ( $h$ ) e a diversidade haplotípica ( $H_d$ ) foram calculados no DnaSP, tanto para as populações amostradas (localidades) quanto para os haplogrupos. Valores de  $\pi > 0,5\%$  e  $H_d > 0,5$  foram considerados elevados, como sugerido por Grant & Bowen (1988). Para detectar possíveis sinais de expansão demográfica, foram aplicados os testes de neutralidade de Tajimas'D (Tajima, 1989) e  $F_u F_s$  (Fu, 1997), além do teste de mudança no tamanho da população  $R_2$  (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), também no DnaSP. A significância desses testes foi determinada com base em mil simulações coalescentes.

Ainda com o objetivo de entender a dinâmica de flutuações do tamanho populacional ao longo do tempo, foi aplicado o método Bayesiano coalescente *Bayesian Skyline Plot* (BSP, Drummond *et al.*, 2005) para cada haplogrupo separadamente. Neste método, utiliza-se uma abordagem não-paramétrica de coalescência das diferentes árvores de genes para estimar a variação do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo e ele tem como vantagem reduzir o efeito da estocasticidade do processo coalescente (Ho & Shapiro, 2011). Na análise de BSP, é necessário incluir as taxas de mutação para cada linhagem (i.e., cada haplogrupo). Para estimar estas taxas, foi construída uma árvore datada através da análise de relógio molecular, com calibração fóssil e usando somente a matriz do COI. Nesta matriz, foram incluídas sequências de todos os haplogrupos de *M. microlepis*, de todos os outros Glandulocaudini e de outras cinco espécies de Characidae, *Asytanax paranae* Eigenmann, *Inpaichthys kerri* Géry & Junk, *Lepidocharax burnsi* Ferreira, Menezes & Quagio-Grassiotto, *L. diamantina* Ferreira, Menezes & Quagio-Grassiotto e *Spintherobolus leptoura*. Sequências destas espécies também foram obtidas no presente estudo, com exceção das de *L. burnsi* e *S. leptoura*, retiradas do *GenBank*, onde foram depositadas por Oliveira *et al.* (2011) e Thomaz *et al.* (2015b), respectivamente. A análise em si foi implementada nos programas do pacote BEAST v. 1.8.0. No BEAUTi, foi gerado o arquivo de entrada, sob os seguintes parâmetros: modelo de substituição HKY+I+G, conforme encontrado por meio do MrModeltest; modelo de relógio *Relaxed Clock Uncorrelated Lognormal*; árvore randômica de partida; e *prior Speciation: Birth-Death Process*. Conforme detalhado no Capítulo 1 desta tese, a calibração foi feita em 27,5 milhões de anos (m.a.), datação média mínima estimada para a cladogênese ( $\dagger$ *Megacheiroduon*, *Spintherobolus*), e *S. leptoura* foi indicado no BEAUTi como *stem group*, conforme sugerido por Forest (2009). A análise em si consistiu de duas corridas simultâneas de 100 milhões de gerações cada, com uma árvore salva a cada 10 mil gerações e *burn-in* de 20%. O desempenho e a convergência dos parâmetros entre as corridas foram analisados no programa Tracer, onde também foi checado

o desempenho da análise (ESS>200). Depois da remoção do *burn-in*, as corridas independentes foram combinadas no LogCombiner v. 1.8.0, a topologia consenso, com o tempo de divergência entre os clados, foi gerada no TreeAnnotator v. 1.8.0. As taxas de mutação de cada haplogrupo foram obtidas a partir desta árvore final, visualizada no FigTree (0,0134/m.a., 0,0147/m.a., 0,015/m.a. e 0,0188/m.a. para os haplogrupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente). O arquivo de entrada da análise de BSP propriamente dita foi, então, gerado no BEAUTi, sob os seguintes parâmetros: modelo de substituição HKI+I para os haplogrupos 1, 3 e 4 e HKI+I+G para o haplogrupo 2, conforme indicado por meio do MrModeltest 2.2 com o AIC; modelo de relógio *Strict clock*; e uma árvore de partida de UPGMA. Na análise de BSP, foram feitas duas corridas simultâneas de 100 milhões de gerações de MCMC cada, com uma árvore salva a cada cinco mil gerações e *burn-in* de 10%. O desempenho e a convergência dos parâmetros entre as corridas foram analisados através do programa Tracer, onde também foi checado o desempenho da análise (ESS>200). A combinação das corridas e remoção do *burn-in* foi feita no LogCombiner v. 1.8.0 e a análise de BSP foi finalizada também no Tracer.

## 2.2. Análises morfológicas

Nas análises morfológicas, foram realizadas contagens e medidas, de acordo com Fink & Weitzman (1974) e Menezes & Weitzman (1990). Os dados morfométricos são apresentados em tabelas como porcentagens do comprimento padrão (CP), exceto com relação às subunidades da cabeça, apresentadas como porcentagens do comprimento da mesma. Contagens de supraneurais, raios branquiostegais e vértebras foram obtidas a partir de exemplares diafanizados e corados (d&c), preparados de acordo com Taylor & Van Dyke (1985). As vértebras do Aparelho de Weber foram contadas como quatro elementos e o centro caudal composto (PU1+U1) como um elemento único. Quando necessário, o sexo dos espécimes foi confirmado por dissecação. Dados referentes ao lectótipo, paralectótipos e parte dos topótipos de *M. microlepis* foram extraídos de Menezes & Weitzman (2009). Gráficos do tipo *BoxPlot* foram gerados por meio do programa R v. 2.10.0 (R Development Core Team, 2009) com base em alguns caracteres merísticos, para melhor compreensão da variação destes caracteres entre as diferentes populações estudadas. A lista do material examinado na análise morfológica é apresentada no 'Apêndice B'. Abreviaturas institucionais são aquelas que constam em Fricke & Eschemeyer (2016).

### 3. Resultados

Os resultados das análises moleculares (sistemática e filogeografia) são apresentados em duas partes. Na primeira, serão disponibilizados resultados mais generalizados, obtidos a partir de análises feitas levando-se em consideração todas as populações (= haplogrupos) de *Mimagoniates microlepis* em conjunto. Já na segunda parte, serão apresentados resultados mais específicos, direcionados para cada um dos agrupamentos propostos nas análises generalizadas. Os resultados das análises morfológicas, por sua vez, serão apresentados em conjunto e de forma comparativa posteriormente.

#### 3.1. Análises moleculares

##### 3.1.1. Características das sequências e das matrizes de dados

No presente estudo, foram obtidas sequências parciais de três genes, sendo dois mitocondriais, 16S rRNA e COI, e um nuclear, RAG2. A matriz do 16S é composta por sequências de 302 indivíduos, sendo 209 pertencentes a *Mimagoniates microlepis* e 97 às demais espécies, que compõem o grupo externo (três exemplares de *Lophiobrycon weitzmani*, 20 de *Glandulocauda melanopleura*, quatro de *G. caerulea*, três de *Mimagoniates inequalis*, 13 de *M. lateralis*, 12 de *M. rheocharis*, 34 de *M. sylvicola*, além de sequências de um exemplar de *Bryconops caudomaculatus*, dois de *Cheirodon ibicuiensis* e um de *Spintherobolus leptoura*). Na matriz do COI, foram incluídas sequências de 362 indivíduos, sendo 255 pertencentes a *M. microlepis* e 107 às espécies do grupo externo (três exemplares de *L. weitzmani*, 20 de *G. melanopleura*, quatro de *G. caerulea*, três de *M. inequalis*, 17 de *M. lateralis*, 21 de *M. rheocharis*, 35 de *M. sylvicola*, além de sequências de um exemplar de *B. caudomaculatus*, dois de *C. ibicuiensis* e um de *S. leptoura*). Todos os espécimes para os quais foram obtidas sequências do 16S também foram obtidas do COI, assim, a matriz mitocondrial concatenada tem a mesma composição da matriz do 16S, já que só foram utilizados, para concatenação, indivíduos nos quais os dois genes foram amplificados e sequenciados (Apêndice A, Tabela 1).

A matriz do RAG2 inclui um número consideravelmente menor de amostras quando comparada às matrizes de genes mitocondriais, em função das dificuldades encontradas na amplificação deste (e de outros) genes nucleares no presente estudo. Esta matriz, entretanto, contém sequências de, pelo menos, dois indivíduos de cada agrupamento de *Mimagoniates microlepis* proposto a partir da análise filogenética com base na matriz mitocondrial, incluindo topótipos. Assim, a matriz nuclear é composta por amostras de 27 indivíduos, sendo 11 delas

pertencentes a *M. microlepis* e 16 às espécies do grupo externo (duas a *L. weitzmani*, duas a *G. melanopleura*, uma a *G. caerulea*, duas a *M. inequalis*, duas a *M. lateralis*, uma a *M. rheocharis*, duas a *M. sylvicola* além de sequências de um exemplar de *B. caudomaculatus*, dois de *C. ibicuiensis* e um de *S. leptoura*) (Apêndice A, Tabela 1).

Em nenhuma das matrizes, os dados foram considerados saturados, já que os valores dos Índices de Saturação de Substituição ( $I_{SS}$ ) obtidos foram menores que os índices de saturação críticos calculados ( $I_{SS} < I_{SS,C}$ ) em todos os genes. Em cada matriz final gerada, o número de sequências obtidas, seu tamanho (pb) após o alinhamento, número de sítios conservados (C) número de sítios variáveis (V) e o número de caracteres informativos (Pi) são apresentado na Tabela 1, abaixo.

**Tabela 1.** Informações sobre as matrizes de dados geradas no presente estudo.

Informações	Matrizes			
	16S	COI	Mitocondrial (concatenada)	RAG2
Número de sequências	302	362	302	27
Tamanho (pb) após alinhamento	537	522	1059	770
Sítios conservados (C)	380	323	702	586
Sítios variáveis (V)	132	199	331	183
Sítios informativos (Pi)	81	42	245	103

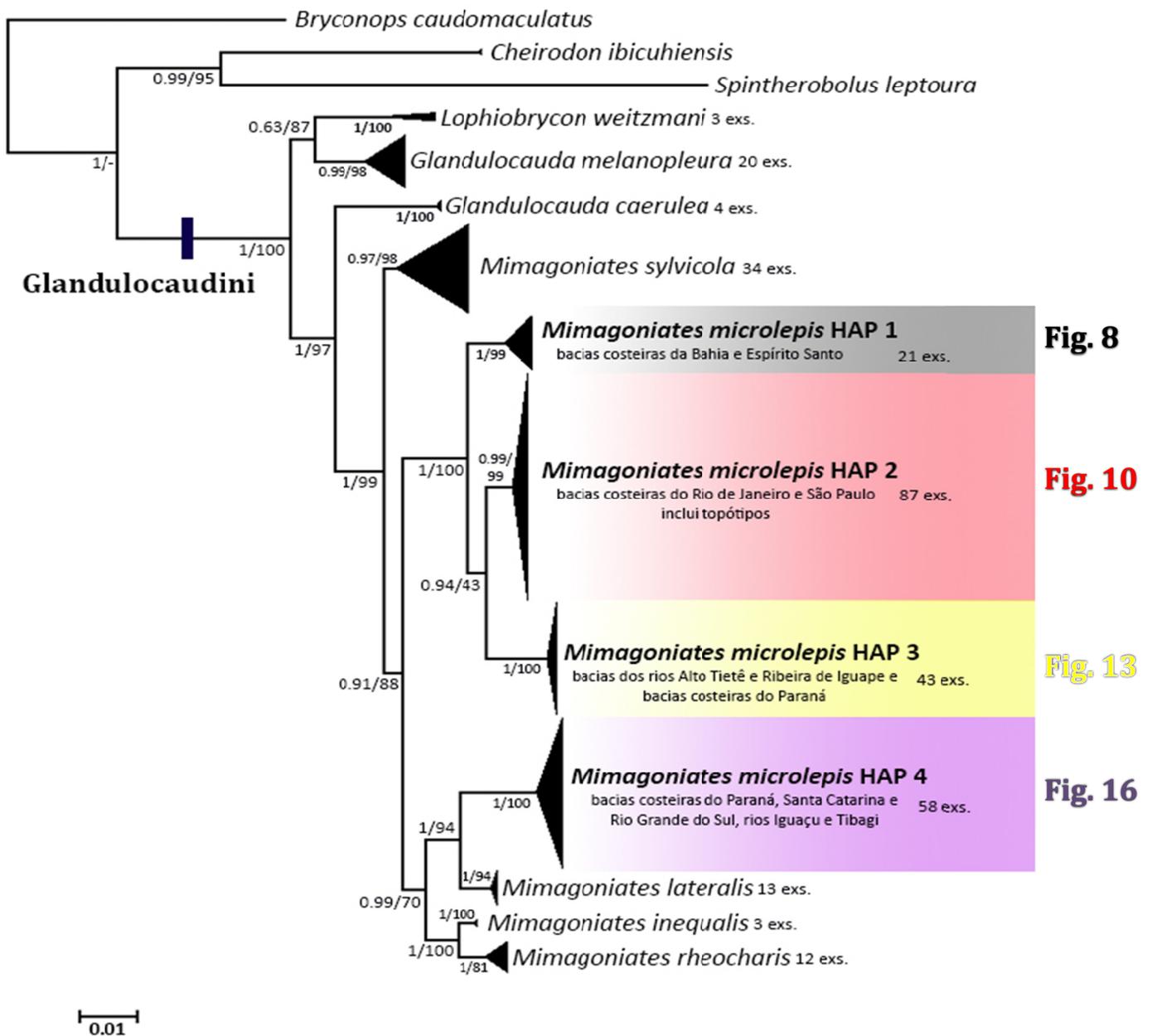
Todas as matrizes de dados utilizadas no presente estudo estão disponíveis no CD-ROM que acompanha esta tese, onde poderão ser consultadas.

### 3.1.2. Análise filogenética: hipóteses baseadas nos genes mitocondriais

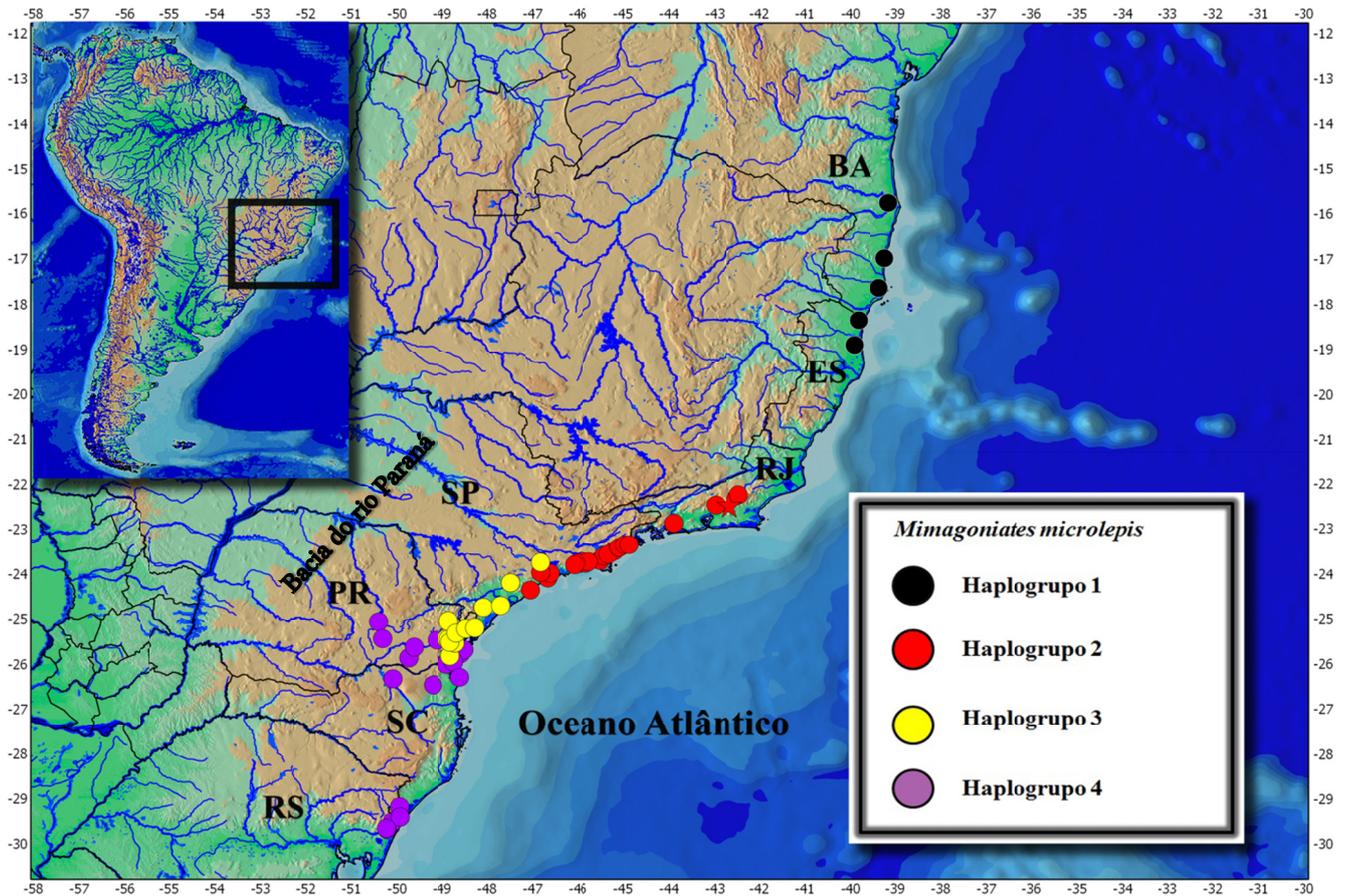
A conformação geral das árvores e as relações obtidas através das análises de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV) da matriz de dados mitocondriais concatenada (1059 pb) são idênticas. Assim, será apresentada apenas a topologia de IB, onde serão indicados, nos respectivos clados formados, além dos valores de probabilidade posterior, os valores de *bootstrap* da análise de MV. Esta árvore é apresentada de forma sumarizada na Fig. 1.

As topologias obtidas a partir de dados mitocondriais indicam uma forte estruturação genética em *M. microlepis*, sendo possível distinguir, nesta espécie, quatro grandes grupos haplotípicos monofiléticos e bem suportados estatisticamente (valores de probabilidade posterior e *bootstrap*  $\geq 0,99$  e 99%, respectivamente). Estes clados, que serão apresentados e discutidos de forma individual e detalhada posteriormente, foram nomeados de 1 a 4, no

sentido norte-sul de distribuição (Fig. 2): Haplogrupo 1 (HAP1): bacias costeiras dos estados da Bahia (BA) e Espírito Santo (ES); Haplogrupo 2 (HAP2): bacias costeiras dos estados do Rio de Janeiro (RJ), incluindo localidade tipo, e São Paulo (SP); Haplogrupo 3 (HAP3): bacias dos rios Alto Tietê (drenagem do rio Paraná) e Ribeira de Iguape (São Paulo), além de bacias costeiras do Estado do Paraná (PR); e Haplogrupo 4 (HAP4): bacias dos rios Iguaçú e Tibagi (drenagem do rio Paraná), além de bacias costeiras dos estados do Paraná, Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).



**Figura 1.** Topologia sumarizada, obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb), mostrando as hipóteses de relação entre *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, com destaque para os quatro haplogrupos propostos no presente estudo. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente e o (-) indica que o clado não foi recuperado por meio da análise de Máxima Verossimilhança.



**Figura 2.** Mapa de distribuição dos quatro haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* propostos no presente estudo. As siglas BA, ES, RJ, SP, PR, SC e RS se referem, respectivamente, aos seguintes estados brasileiros: Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A estrela (HAP2) representa a localidade tipo da espécie.

Em nenhuma das análises baseadas na matriz de dados mitocondriais, *M. microlepis* aparece com uma unidade monofilética, uma vez que o HAP4, de distribuição mais ao sul, é mais relacionado a *M. lateralis* do que aos demais haplogrupos de *M. microlepis*, formando um clado muito bem suportado com esta outra espécie (1 de probabilidade posterior e 94% de *bootstrap*, Fig. 1). Aqui, é interessante destacar que foram incluídas na análise amostras de toda a distribuição conhecida de *M. lateralis* (i.e., drenagens costeiras dos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, Menezes & Weitzman, 2009), cujo monofiletismo não foi contestado no presente estudo. A relação entre os indivíduos de *M. lateralis* não foi apresentada, mas estes formaram uma politomia basal dentro da espécie.

Desconsiderando o HAP4, *M. microlepis* é recuperada como um grupo monofilético bem suportado, mas, ainda, com forte estruturação genética ao longo da sua distribuição, representada pelos demais haplogrupos formados. *Mimagoniates microlepis sensu stricto* é representado pelo HAP2, pois, neste grupo, estão incluídos topótipos da espécie. Apesar do suporte não muito alto, os dados mitocondriais apontam para uma relação mais estreita entre os HAP2 e HAP3, representados por populações ocorrentes em uma parte intermediária da

distribuição de *M. microlepis* (Fig. 2). O HAP1, que representa a distribuição mais ao norte da espécie, estaria, então, relacionado ao clado (HAP2, HAP3). As relações dentro de cada um dos haplogrupos serão apresentadas e discutidas em detalhe posteriormente.

As topologias obtidas (IB e MV) a partir de dados mitocondriais também indicam que *M. microlepis*, considerando aqui os quatro haplogrupos, é mais relacionado às espécies *M. lateralis*, *M. inequalis* e *M. rheocharis* do que a *M. sylvicola*, com suporte moderado para este agrupamento (0,91 de probabilidade posterior e 88% de *bootstrap*). Aqui, é importante destacar que, destas espécies, *M. microlepis* tem distribuição sobreposta a *M. lateralis*, *M. rheocharis* e *M. sylvicola*. A ocorrência em simpatria com *M. rheocharis* e, mais raramente, com *M. lateralis* foi registrada por Menezes *et al.* (2007), mas a distribuição simpátrica entre *M. microlepis* e *M. sylvicola* é registrada aqui, pela primeira vez, na bacia do rio Pardo, Bahia (*M. microlepis*, MZUSP 112657 e *M. sylvicola*, MZUSP 112663), e também em uma pequena bacia costeira do extremo sul deste estado (MZUSP 112651 e 112652, respectivamente). Ainda, de acordo com as árvores obtidas, as espécies de *Mimagoniates* analisadas no presente estudo formam um grupo monofilético, proximamente relacionado a *Glandulocauda caerulea* e este clado é grupo irmão de (*Lophiobrycon weitzmani*, *Glandulocauda melanopleura*) (Fig. 1).

Como será visto adiante, além das inferências filogenéticas, outras análises moleculares realizadas no presente estudo com base em dados mitocondriais também apontam para uma forte estruturação genética em *M. microlepis* e indicam que este pode ser um nome utilizado para abrigar, pelo menos, duas espécies.

### **3.1.3. Análise filogenética: hipóteses baseadas no gene nuclear**

Com mencionado na seção ‘Material & Métodos’, apesar do número de sequências consideravelmente menor, estão representados na matriz do RAG2, todos os haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* propostos pela análise com base nos genes mitocondriais. Com exceção dos rios costeiros do Rio Grande do Sul (onde também ocorre o HAP4), de uma forma geral, a amostragem do RAG2 cobre toda a distribuição da espécie, incluindo, pelo menos, um indivíduo de drenagens costeiras da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro (inclusive topótipo), São Paulo, Paraná e Santa Catarina, além de espécimes dos rios Alto Tietê, Iguaçu e Ribeira de Iguape.

As topologias obtidas através das análises de IB e MV baseadas na matriz do gene nuclear RAG2 (770 pb) são idênticas com relação ao grupo interno. Assim, será apresentada apenas a árvore de IB, onde serão indicados além dos valores de probabilidade posterior, os valores de *bootstrap* da análise de MV (Fig. 3). Os resultados das árvores geradas com base no

gene nuclear são bem diferentes daqueles gerados com base nos genes mitocondriais. Aqui, *M. microlepis* aparece como um grupo monofilético de suporte moderado (0,8 de probabilidade posterior e 75% de *bootstrap*), onde estão incluídos todos os quatro haplogrupos mencionados anteriormente. Além disto, o gene nuclear não recupera a mesma estruturação proposta pelos genes mitocondriais dentro da espécie. Nas análises baseadas no RAG2, apenas o HAP4 está estruturado, formando um clado. Exceto pela relação entre um indivíduo do HAP2 (da bacia do rio Itanhaém) e um do HAP3 (bacia do rio Ribeira de Iguape), as relações entre os diferentes haplogrupos não foram satisfatoriamente esclarecidas, uma vez que estes estão arranjados em uma politomia basal dentro de *M. microlepis* (Fig. 3).



**Figura 3.** Topologia obtida através da análise de Inferência da matriz do gene nuclear RAG2 (770 pb), mostrando as hipóteses de relação entre *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, com destaque para os quatro haplogrupos propostos no presente estudo com base no mtDNA. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente e o (-) indica que o clado não foi recuperado por meio da análise de Máxima Verossimilhança.

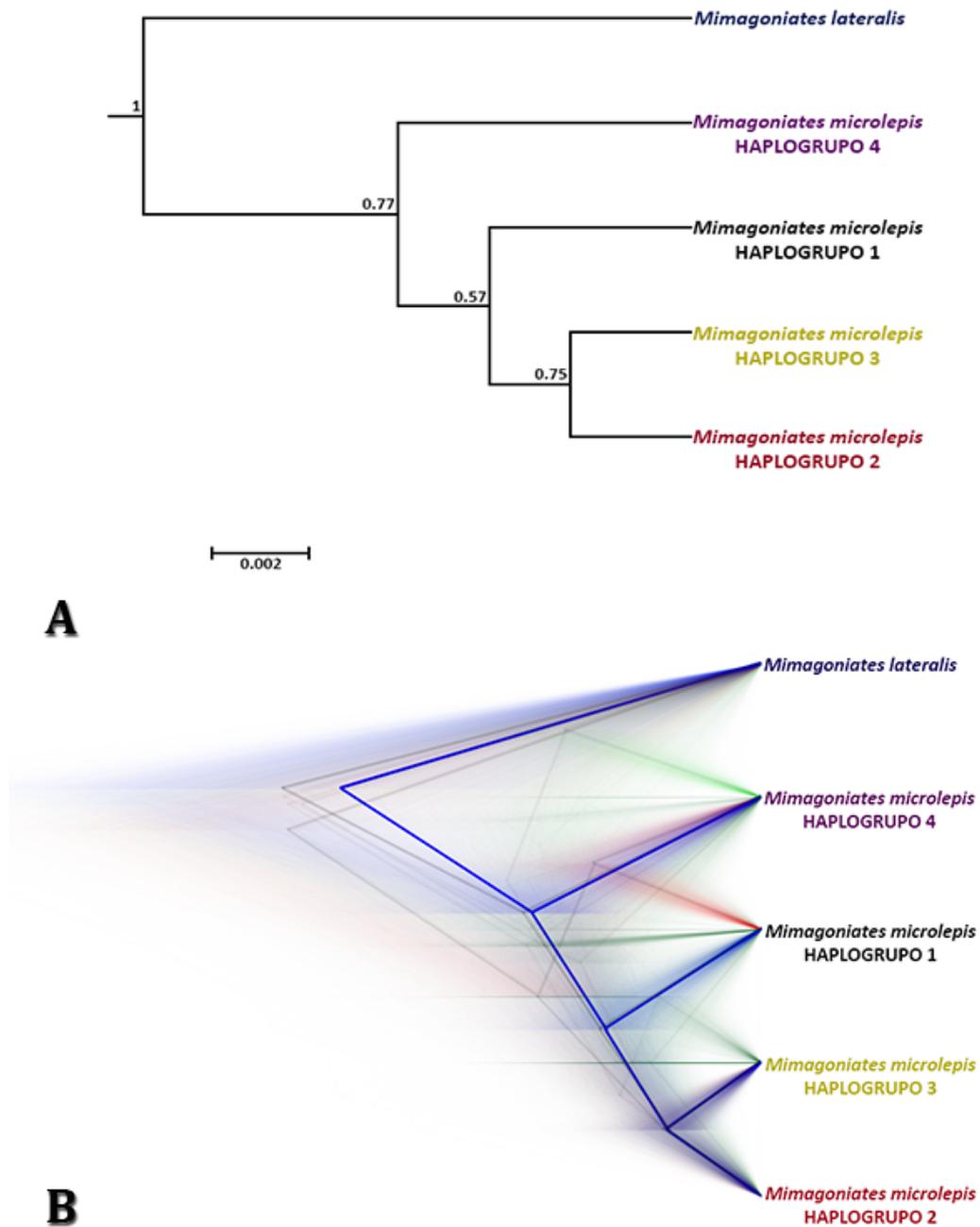
A única semelhança entre as topologias baseadas em dados mitocondriais e as baseadas no RAG2, está no fato das espécies de *Mimagoniates* analisadas no presente estudo formarem um grupo monofilético. Todas as outras relações de parentesco propostas são diferentes. Segundo as árvores de gene nuclear, *M. microlepis* é mais relacionado a *M. sylvicola*, formando um clado bem suportado, que é grupo irmão de (*M. rheocharis* (*M. inequalis*, *M. lateralis*)). Ainda, segundo o marcador nuclear utilizado, as hipóteses de relações entre *Mimagoniates*, *Lophobrycon* e *Glandulocauda* são controversas. De acordo com a análise de IB, a proposta de relação é (*L. weitzmani* (*G. caerulea* (*G. melanopleura*, *Mimagoniates* spp.))), mas o suporte dos nós é muito baixo (Fig. 3). Já a análise de MV (não apresentada aqui) sugere como hipótese a relação (*G. melanopleura* ((*L. weitzmani*, *G. caerulea*) *Mimagoniates* spp.)), com suporte também baixo (*bootstrap* entre 50-52%). A discussão destas discordâncias, no entanto, não está no escopo deste trabalho, que tem como foco *M. microlepis*.

#### 3.1.4. Árvore de espécies (*Species Tree*)

A árvore de espécies (Fig. 4a) gerada através do \*BEAST foi parcialmente congruente com as reconstruções filogenéticas baseadas no RAG2 e nos genes mitocondriais. Apesar do suporte não muito alto, de acordo com esta análise, *Mimagoniates microlepis* é recuperada como monofilética, como também proposto nas topologias do RAG2 (Fig. 3). Diferente destas, mas de maneira similar às topologias baseadas nos genes mitocondriais (Fig. 1), a árvore de espécie indica relação mais estreita entre os HAP1, HAP2 e HAP3, com a seguinte conformação (HAP1 (HAP3, HAP2)). Ainda segundo a árvore de espécies, este clado seria relacionado ao HAP4. Os valores de probabilidade posterior destas relações, no entanto, também são baixos.

Através da análise, foram geradas 18 mil árvores que originaram algumas topologias distintas. As topologias encontradas podem ser visualizadas no *cloudogram* gerado no DensiTree (Fig. 4b), que fornece uma abordagem qualitativa das diferenças entre elas. As inconsistências entre as árvores de genes mitocondrial e nuclear, bem como as incertezas existentes entre as relações internas de *M. microlepis* e entre *M. lateralis* e o HAP4 ficam evidenciadas no padrão de colorido e intensidade das linhas apresentadas no *cloudogram*. As linhas exibidas representam consensos das árvores encontradas com cada uma das topologias, sendo o colorido e intensidade dos traços, portanto, correspondentes às frequências destas topologias nas análises das 18 mil árvores. A linha azul mais escura indica a árvore de espécies com maior probabilidade posterior, as demais linhas em azul indicam as topologias mais comuns, seguidas das linhas em vermelho (segunda mais comum) e em verde (terceira). As demais árvores são representadas por linhas em verde escuro. As relações internas em cada

haplogrupo de *M. microlepis* e em *M. lateralis* foram recuperadas em 100% das árvores, indicando que todos os indivíduos inseridos em cada um destes agrupamentos, de fato, pertencem a eles.



**Figura 4.** (A) Árvore de espécies reconstruída por meio da análise combinada das matrizes mitocondrial (concatenada, 16S + COI) e nuclear (RAG2) (238 indivíduos), indicando as relações entre os quatro haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* propostos no presente estudo e entre estes e *Mimagoniates lateralis*; os números indicam o valor de probabilidade posterior de cada nó. (B) *Cloudgram* gerado a partir da sobreposição de todas as 18 mil árvores retidas após o *burn-in*; as linhas em azul representam as topologias mais comuns, seguidas das em vermelho e verde, e a linha azul mais escura representa a árvore de espécies com maior probabilidade posterior.

### 3.1.5. Análise de *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC)

Na análise de GMYC, o tempo limite (T, i.e., tempo passado desde o presente até a raiz) obtido foi de -0,007639826, indicando que todos os nós antes deste tempo refletem eventos de diversificação e todos aqueles localizados depois refletem eventos coalescentes, a probabilidade do modelo nulo foi 4602,009 e a probabilidade máxima do modelo GMYC foi 4631,357. A fronteira entre divergência inter e intraespecífica é representada, na árvore ultramétrica gerada, pela linha vermelha (Fig. 5), assim, todos os nós antes desta linha (sentido raiz-táxons terminais) indicam eventos de diversificação (espécies) e os nós após a linha indicam eventos coalescentes (populações). Aqui, é importante salientar que a análise de GMYC não visa propor relações de parentesco, e sim estabelecer limites de espécies, de maneira que o resultado obtido deve ser interpretado apenas neste sentido.

Em linhas gerais, os resultados da análise de GMYC, baseada no gene COI, também indicam que *Mimagoniates microlepis* pode ser um nome utilizado para abrigar mais de uma espécie e recuperam os quatro grandes haplogrupos mencionados anteriormente como unidades evolutivas independentes (Fig. 5a). De acordo com esta análise, no entanto, os HAP2 e HAP4 não representam uma entidade única. Assim, através do GMYC, foram reconhecidas, sob o nome *M. microlepis*, seis unidades distintas e bem delimitadas, distribuídas de norte a sul da seguinte maneira: (1) HAP1, com distribuição em drenagens costeiras da Bahia e Espírito Santo; (2) HAP2\_norte, com distribuição em drenagens costeiras do Rio de Janeiro (incluindo a localidade tipo) e São Paulo até Caraguatatuba, que seria *M. microlepis sensu stricto* por incluir topótipos; (3) HAP2\_sul, distribuído em drenagens costeiras de São Paulo, entre São Sebastião e Peruíbe; (4) HAP3, com distribuição nas bacias dos rios Alto Tietê, Ribeira de Iguape e em rios costeiros do Paraná; (5) HAP4\_norte, distribuído em bacias costeiras do Paraná e Santa Catarina, além dos rios Iguazu e Tibagi; e (6) HAP4\_sul, com distribuição em rios costeiros do extremo sul de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul (Fig. 5b).



### 3.1.6. DNA Barcoding

Levando em consideração a premissa de variação genética de até 2% para o reconhecimento de complexos de espécies ou espécies distintas pelo método de *DNA Barcoding*, os valores de divergência entre os seis haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* (propostos pelo GMYC) também indicam que este pode se tratar de um nome utilizado pra abrigar mais de uma espécie. O número de entidades reconhecidas através do *DNA Barcoding*, no entanto, é menor do que aquelas propostas pelo GMYC, uma vez que, de acordo com os valores encontrados, não há divergência suficiente (i.e., >2%) dentro dos HAP2 e HAP4 (HAP2\_norte e sul e HAP4\_norte e sul, respectivamente), para justificar o reconhecimento de mais de uma espécie nestes grupos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores de divergência genética (%) entre as seis unidades de *Mimagoniates microlepis* (255 exs.) estabelecidas através da análise de GMYC, *M. inequalis* (3 exs.), *M. lateralis* (17 exs.), *M. rheocharis* (21 exs.), *M. sylvicola* (35 exs.), *Glandulocauda caerulea* (4 exs.), *G. melanopleura* (20 exs.) e *Lophiobrycon weitzmani* (3 exs.). Resultados obtidos através do modelo Kimura-2 parâmetros e com base na matriz de dados do COI (524 pb).

Espécies/Haplogrupo	Divergência genética (%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Haplogrupo 1													
Haplogrupo 2_norte	4												
Haplogrupo 2_sul	5	1											
Haplogrupo 3	6	5	5										
Haplogrupo 4_norte	8	7	8	9									
Haplogrupo 4_sul	9	8	8	8	2								
<i>Mimagoniates inequalis</i>	7	7	7	7	8	8							
<i>Mimagoniates lateralis</i>	8	9	8	9	5	5	6						
<i>Mimagoniates rheocharis</i>	8	8	8	9	8	8	3	6					
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	8	8	9	8	8	8	6	7	6				
<i>Glandulocauda caerulea</i>	10	11	11	10	12	12	9	11	9	8			
<i>Glandulocauda melanopleura</i>	12	12	12	13	13	13	10	11	10	10	11		
<i>Lophiobrycon weitzmani</i>	13	12	13	14	14	13	10	11	11	11	11	8	

Assim, de acordo com o método de *DNA Barcoding*, *M. microlepis* representa um complexo de espécies, no qual seriam reconhecidas quatro unidades bem definidas (= os quatro haplogrupos indicados através da análise filogenética com base na matriz de genes mitocondriais), com valores de divergência genética entre elas variando de 5 a 9% (Tabela

3). Os HAP3 e HAP4 são os mais divergentes entre si (9%) e as menores divergências estão entre os HAP1 e HAP2 e entre o HAP2 e HAP3, ambas com 5%.

**Tabela 3.** Valores de divergência genética (%) entre os quatro haplogrupos de *Mimagoniates microlepis*, baseados no modelo Kimura-2 parâmetros e na matriz de dados do COI (524 pb).

<i>Mimagoniates microlepis</i> Haplogrupo (exemplares)	Divergência genética (%)		
	1	2	4
Haplogrupo 1 (22)			
Haplogrupo 2 (108)	5		
Haplogrupo 3 (53)	6	5	
Haplogrupo 4 (72)	8	8	9

### 3.1.7. Análises filogeográficas

Nas análises filogeográficas, foram utilizadas sequências de 255 exemplares de *Mimagoniates microlepis* de 60 localidades (= pontos distintos de coleta) ao longo de toda a distribuição da espécie, que inclui drenagens costeiras desde o Estado da Bahia (limite norte) até o Rio Grande do Sul (limite sul), incluindo a localidade tipo (no Rio de Janeiro), além do rio Ribeira de Iguape e das bacias dos rios Alto Tietê, Iguazu e Tibagi, sendo estes três últimos importantes afluentes da bacia do rio Paraná (Fig. 2). Como indicado no ‘Material & Métodos’, estas análises foram baseadas apenas no gene mitocondrial COI, cuja matriz, para esta espécie, possui um total de 524 pb após alinhamento, 436 sítios conservados, 88 variáveis e 80 informativos.

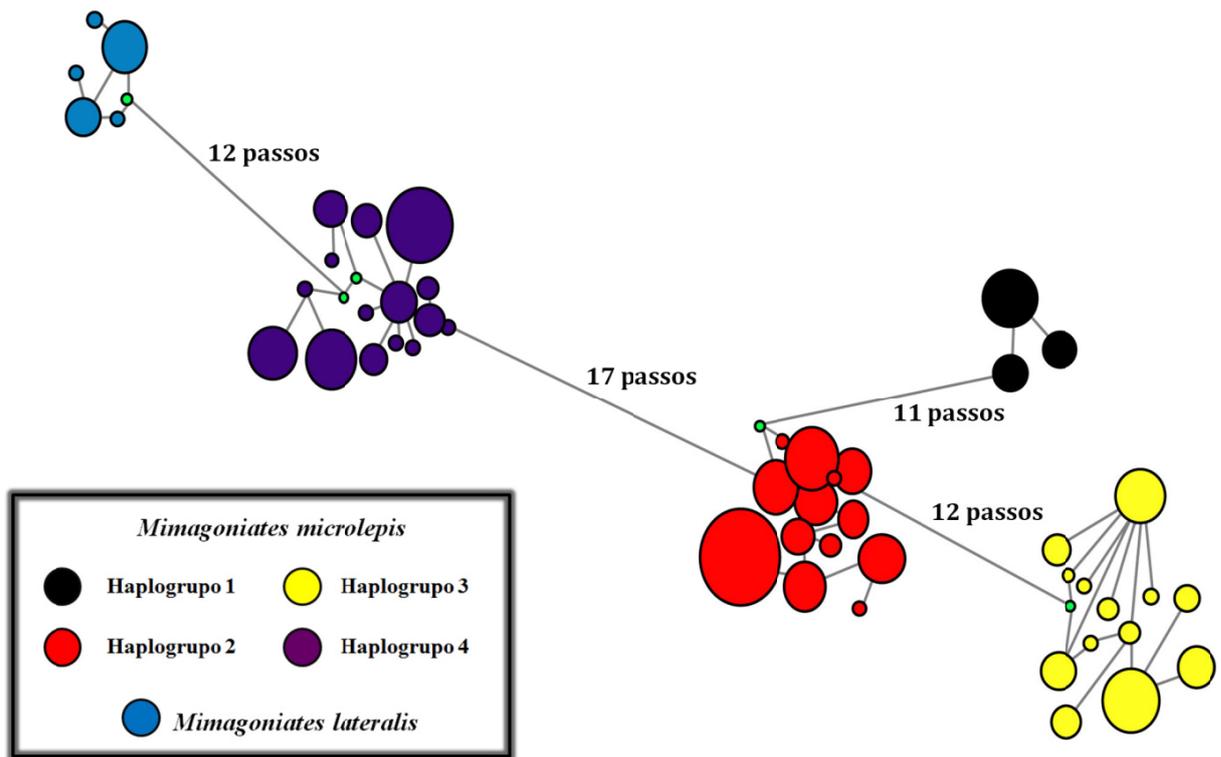
#### 3.1.7.1. Estrutura filogeográfica

A rede de haplótipos do COI, considerando todas as amostras de *M. microlepis* juntas, recuperou a mesma estruturação observada nas filogenias baseadas nos genes mitocondriais (Fig. 1) com distinção clara de quatro haplogrupos, que não compartilham haplótipos entre si (Fig. 6). O HAP2, representado pelas populações de bacias costeiras do Rio de Janeiro (incluindo localidade tipo) e São Paulo, aparece como haplogrupo central. Em ordem crescente, este haplogrupo difere dos HAP1, HAP3 e HAP4 por 11, 12 e 17 passos mutacionais, respectivamente. *Mimagoniates lateralis* difere do HAP4 por nove passos mutacionais (Fig. 6). As redes individuais e peculiaridades dentro de cada um destes haplogrupos serão apresentadas e detalhadas posteriormente. As estimativas da AMOVA também corroboraram as evidências

de forte estruturação genética em *M. microlepis*, especialmente entre os diferentes haplogrupos e entre populações (= locais de coleta) dentro destes grupos (Tabela 4). Os valores de todos os índices de fixação da AMOVA foram considerados altamente significativos ( $p=0,00000+0,00000$ ).

**Tabela 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) de *Mimagoniates microlepis*, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). GL: grau de liberdade;  $p=0,00000$ .

Níveis hierárquicos	GL	Percentual de variação	Índices de fixação
Entre grupos	3	82,93	$F_{CT} = 0,83$
Entre populações dentro dos grupos	44	12,12	$F_{ST} = 0,95$
Dentro de populações	207	4,95	$F_{SC} = 0,71$



**Figura 6.** Rede de haplótipos inferida a partir de 524 pb do gene mitocondrial COI de 255 indivíduos de *Mimagoniates microlepis* e 13 de *M. lateralis*. Cada haplótipo é representado por um círculo e seu tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos/haplogrupos e nelas estão indicados os passos mutacionais que o diferem. As cores representam os haplogrupos de *M. microlepis* e a espécie *M. lateralis*, conforme indicado na legenda. Os círculos em verde representam os vetores medianos (i.e., mutações adicionais).

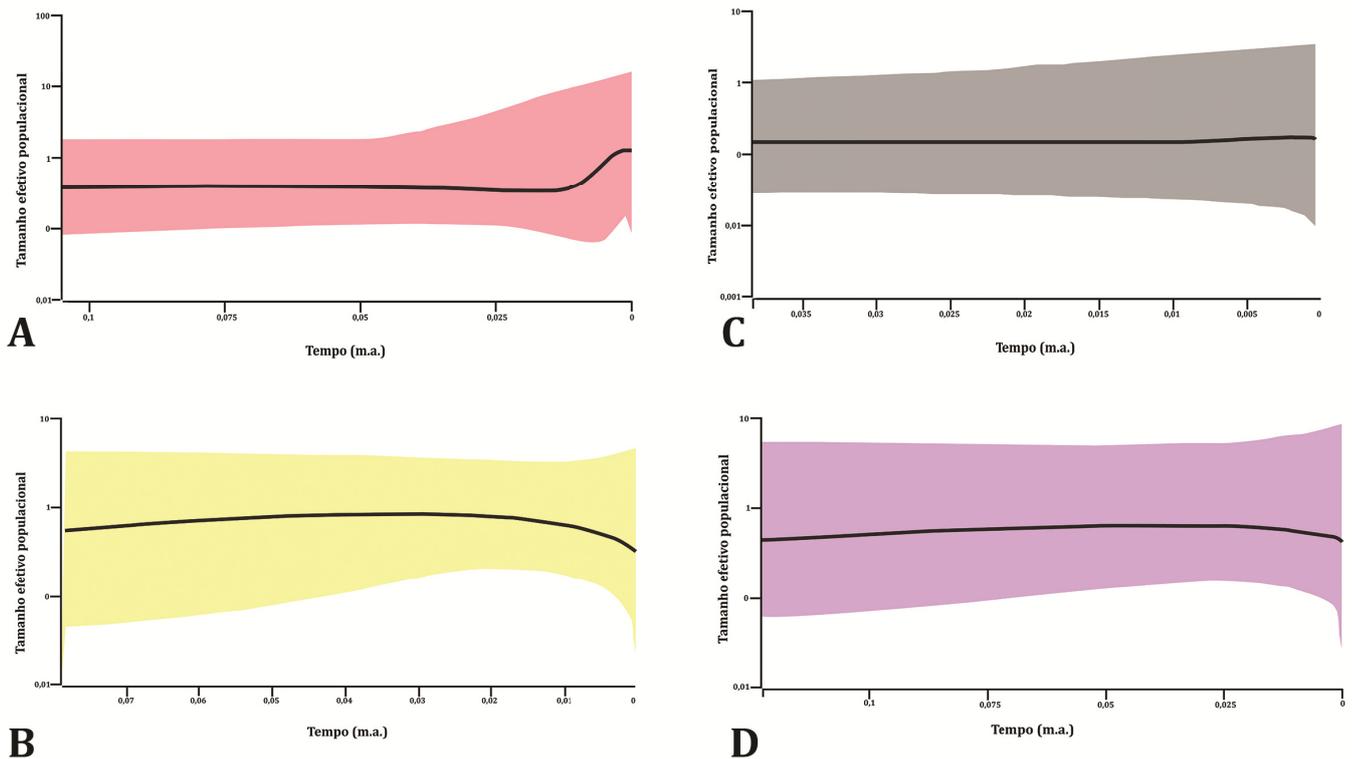
### 3.1.7.2. História demográfica

Assim como as análises filogeográficas, as análises de demografia histórica também foram realizadas com base na matriz do gene mitocondrial COI (524 pb). As estatísticas sumárias de cada um dos haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* são apresentadas na Tabela 5. Todos os haplogrupos apresentaram valores elevados de diversidade haplotípica ( $Hd > 0,5$ ), sendo que o maior valor foi para o HAP3 ( $Hd=0,932$ ) e o menor para o HAP1 ( $Hd=0,662$ ). Os HAP1 foi o único que apresentou baixo valor de diversidade nucleotídica ( $\pi=0,4\%$ ), enquanto os HAP2, HAP3 e HAP4 apresentaram valores elevados para esta medida de variação ( $\pi= 0,9\%$ ,  $0,7\%$ ,  $1,1\%$ , respectivamente). O menor e maior valor de  $\pi$  foi encontrado, portanto, para o HAP1 e HAP4, respectivamente. Os testes de neutralidade (D e  $F_s$ ) não evidenciaram nenhum sinal de expansão demográfica significativo para nenhum dos haplogrupos. Já o teste  $R_2$  indicou expansão demográfica em todos os haplogrupos, especialmente para os HAP2 e HAP4.

**Tabela 5.** Estatísticas sumárias e valores dos testes de neutralidade de D e  $F_s$  e do teste de mudança no tamanho populacional  $R_2$  do gene mitocondrial COI (524pb) de *Mimagoniates microlepis*. N: tamanho amostral; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; dp: desvio padrão;  $\pi$ : diversidade nucleotídica por sítio; ns: não significativo; \* $p=0,000000$ .

Haplogrupo	N	h	Hd (dp)	$\pi$ (dp)	D	$F_s$	$R_2$
HAP1	22	5	0,662 (0,089)	0,00403 (0,00073)	0,32048 <sup>ns</sup>	1,001 <sup>ns</sup>	0,13603*
HAP2	108	16	0,885 (0,018)	0,00916 (0,00030)	0,67064 <sup>ns</sup>	-1,551 <sup>ns</sup>	0,09061*
HAP3	53	16	0,932 (0,013)	0,00685 (0,00033)	-0,32130 <sup>ns</sup>	-4,032 <sup>ns</sup>	0,16108*
HAP4	72	15	0,886 (0,023)	0,01145 (0,00066)	0,13989 <sup>ns</sup>	-0,942 <sup>ns</sup>	0,09801*

Apesar dos elevados limites de valores de confiança, as estimativas de demografia histórica com base no gene mitocondrial COI realizadas através do BSP evidenciaram expansão demográfica no HAP2 iniciada por volta de 0,01 milhões de anos atrás (m.a.) (Fig. 7a). Com relação ao HAP3, a análise de BSP indicou um leve declínio no tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) também iniciado por volta de 0,01 m.a. (Fig. 7b). Já com relação aos HAP1 e HAP4, o BSP não evidenciou mudanças aparentes no  $N_e$  ao longo do tempo, sugerindo estabilidade nestes haplogrupos (Figs. 7c e 7d, respectivamente).



**Figura 7.** Estimativas da análise de *Bayesian Skyline Plot* (BSP) para os haplogrupos de *Mimagoniates microlepis*. A) Haplogrupo 2; B) Haplogrupo 3; C) Haplogrupo 1; D) Haplogrupo 4. A linha do meio representa a mediana da estimativa e as linhas superior e inferior de 95% de HPD (*Highest Posterior Density*), respectivamente. O eixo Y está em escala logarítmica. O eixo X representa milhões de anos (m.a.).

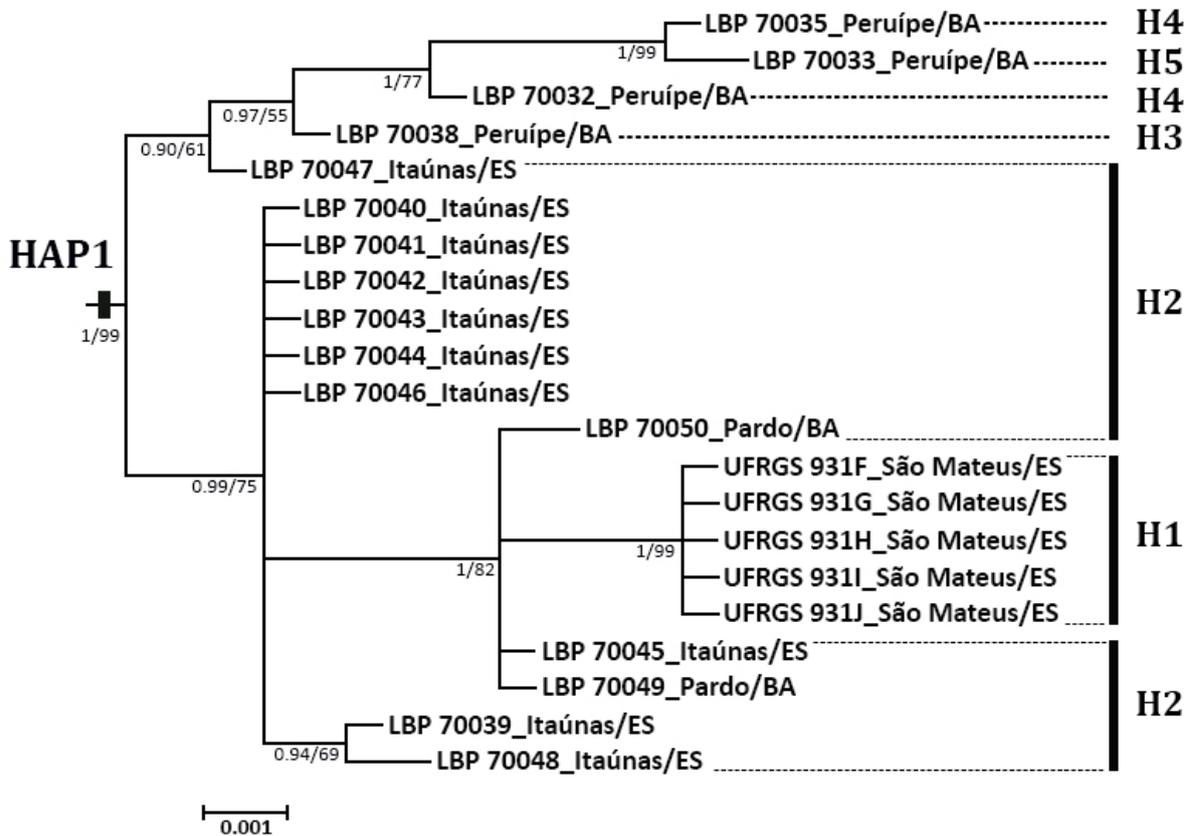
Os resultados específicos de cada um dos haplogrupos individualmente são apresentados abaixo.

## HAPLOGRUPPO 1 – LITORAL BA + ES

De acordo com as análises baseadas nos genes mitocondriais (IB e MV), este grupo haplotípico (HAP1) forma um clado muito bem suportado (Fig. 1), composto por indivíduos pertencentes a populações de bacias costeiras dos estados da Bahia e do Espírito Santo (Fig. 2), tendo como limite norte de distribuição a bacia do rio Pardo, em Canavieiras (BA), e limite sul um riacho costeiro em São Mateus (ES).

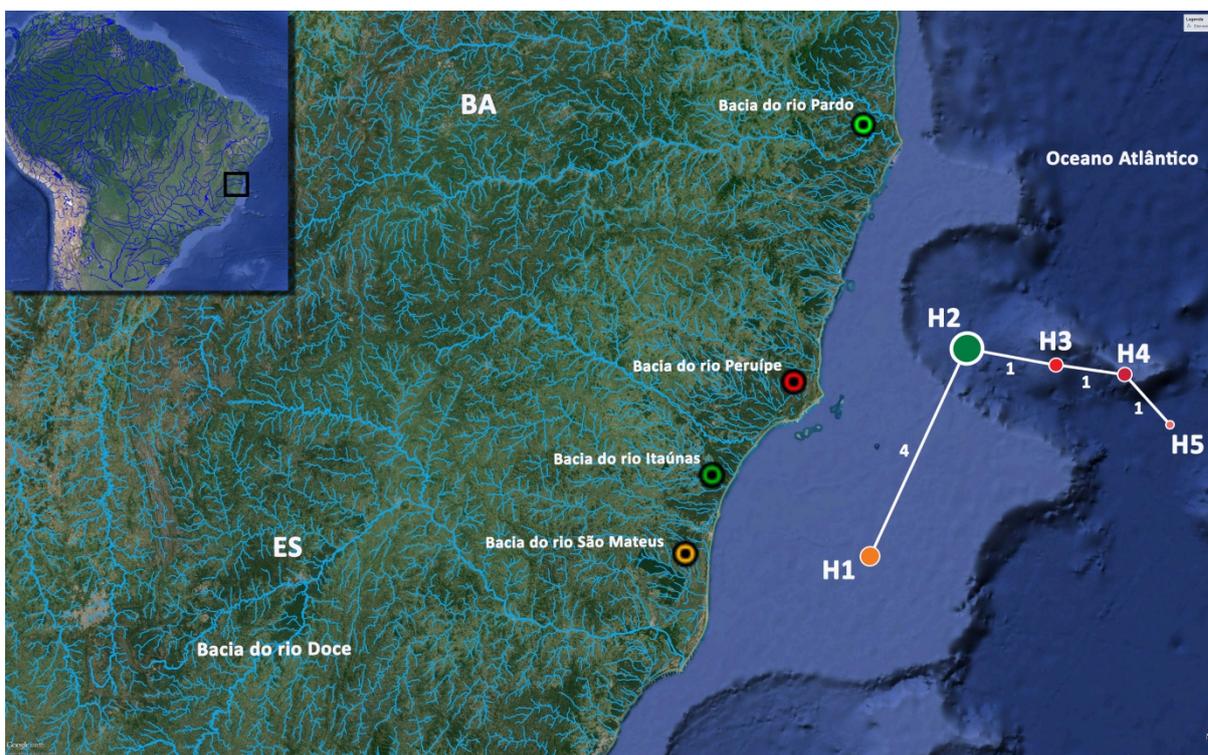
Ainda de acordo com as topologias baseadas nos genes mitocondriais, não há formação clara de nenhum agrupamento dentro do HAP1, principalmente por causa de indivíduos da bacia do rio Itaúnas (ES) (Fig. 8). A análise de GMYC também indica que o HAP1 representa uma entidade única (Fig. 5). O valor de divergência genética interna, baseado apenas na matriz do COI (22 indivíduos), é de 0,4%. Na análise filogenética baseada no gene nuclear, foram

incluídos dois indivíduos do HAP1, um da bacia do rio Pardo e outro da bacia do rio Itaúnas. Como mencionado anteriormente, nesta análise, entretanto, não foi recuperada a estruturação encontrada através dos genes mitocondriais e estes indivíduos não formaram um agrupamento distinto (Fig. 3).



**Figura 8.** Parte da topologia obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb) de *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, destacando o Haplogrupo 1. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente. Os haplótipos (H) correspondentes do gene COI (524 pb) também são indicados para cada indivíduo/grupo.

O HAP1 é composto por cinco haplótipos ocorrentes em quatro bacias hidrográficas. A rede de haplótipos do HAP1 é apresentada na Fig. 9. O haplótipo central da rede (H2) é o mais frequente e também o único compartilhado, ocorrendo nas bacias dos rios Pardo (BA) e Itaúnas (ES). O haplótipo H1, separado do H2 por quatro passos mutacionais, é exclusivo de um riacho costeiro na cidade de São Mateus (ES). Já na bacia do rio Peruípe (BA), há três haplótipos distintos e exclusivos (H3, H4 e H5), sendo o H4 central e separado dos demais por apenas um passo mutacional. A conexão entre os haplótipos da bacia do Peruípe e o haplótipo central do HAP1 (H2) se dá através do haplótipo H3, que se separa do H2 por apenas um passo mutacional.



**Figura 9.** Distribuição do Haplogrupo 1 de *Mimagoniates microlepis* em bacias costeiras da Bahia e Espírito Santo e rede de haplótipos deste haplogrupo, inferida a partir de 524 pb do gene mitocondrial COI. Na rede, cada haplótipo é representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e o valor indicado nestas linhas corresponde ao número de mutações entre eles. As cores dos símbolos do mapa e dos círculos das redes são correspondentes.

Na análise de variância molecular (AMOVA), foram consideradas populações de todas as bacias, pois cada uma delas tinha mais de dois indivíduos coletados (ver ‘Material & Métodos’). As estatísticas sumárias de cada uma destas localidades (neste caso, bacias) são apresentadas na Tabela 6. A bacia do rio Peruípe (única com mais de um haplótipo) apresentou elevada diversidade haplotípica ( $Hd=0,8$ ) e baixa diversidade nucleotídica ( $\pi=0,2\%$ ). Os resultados da AMOVA indicaram elevado percentual de variação entre as bacias, recuperando uma estruturação genética não evidenciada nas análises filogenéticas (Tabela 7).

**Tabela 6.** Estatísticas sumárias de cada localidade do HAP1, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). N: tamanho da amostra; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica por sítio; dp: desvio padrão.

Localidades	N	h	Hd/dp	$\pi$ /dp
Pardo	3	1	0,000	0,00000
Peruípe	5	3	0,800/0,164	0,00191/0,00053
Itaúnas	10	1	0,000	0,00000
São Mateus	5	1	0,000	0,00000

**Tabela 7.** Análise de variância molecular (AMOVA) do HAP1, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). GL: grau de liberdade; p=0,00000.

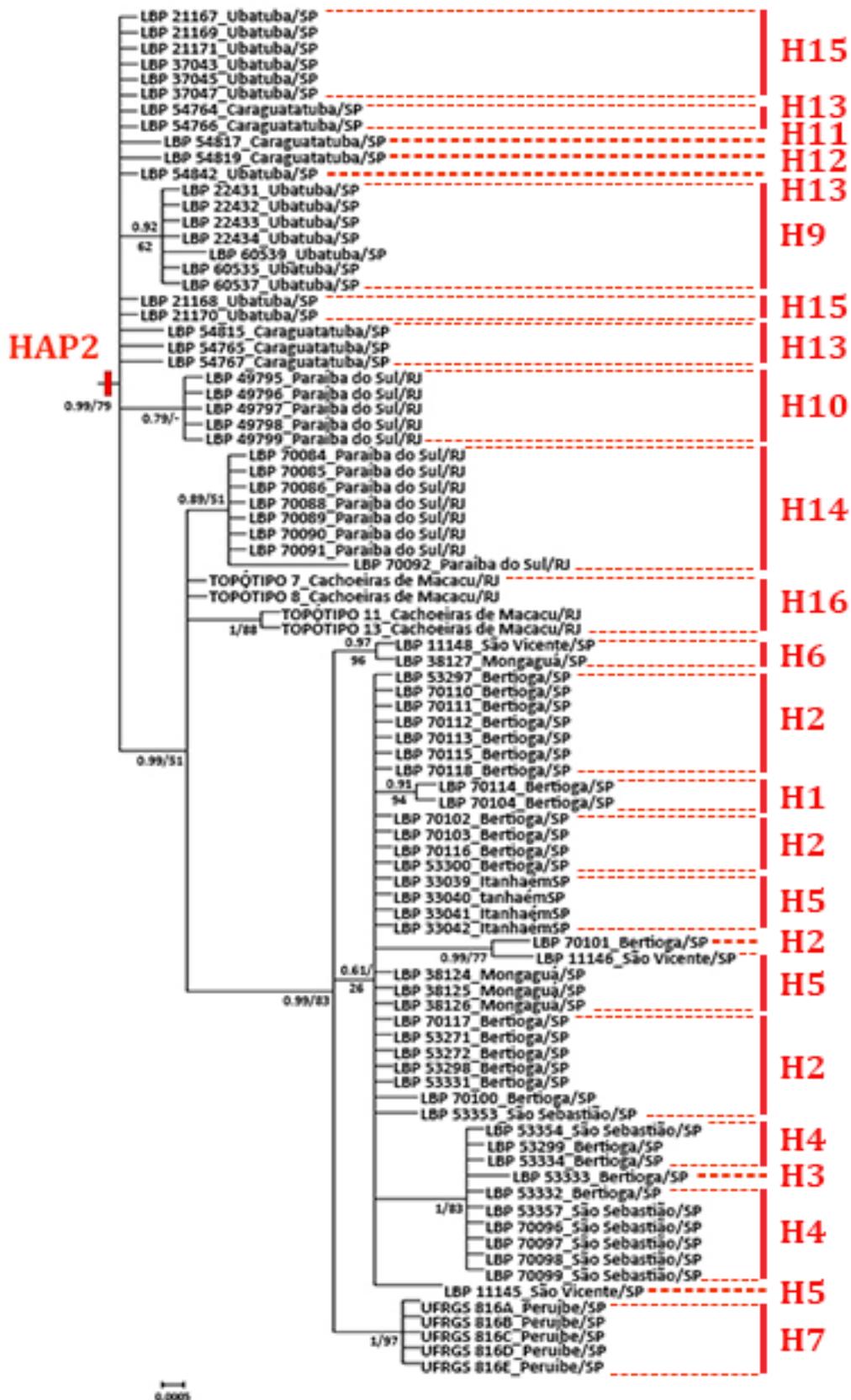
Níveis hierárquicos	GL	Percentual de variação	Índice de fixação ( $F_{ST}$ )
Entre populações	3	92,25	
Dentro de populações	18	7,75	0,92254

Como mencionado anteriormente, o teste de mudança no tamanho da população ( $R_2$ ) indicou uma expansão demográfica significativa dentro do HAP1 (Tabela 5). Esta expansão, no entanto, não foi corroborada através dos testes de neutralidade (D e  $F_S$ ) e da análise de BSP, cujos resultados não detectaram indícios de expansão ou declínio populacional significativos dentro deste haplogrupo (Tabela 5 e Fig. 7c, respectivamente).

## HAPLOGRUPPO 2 – LITORAL RJ + SP

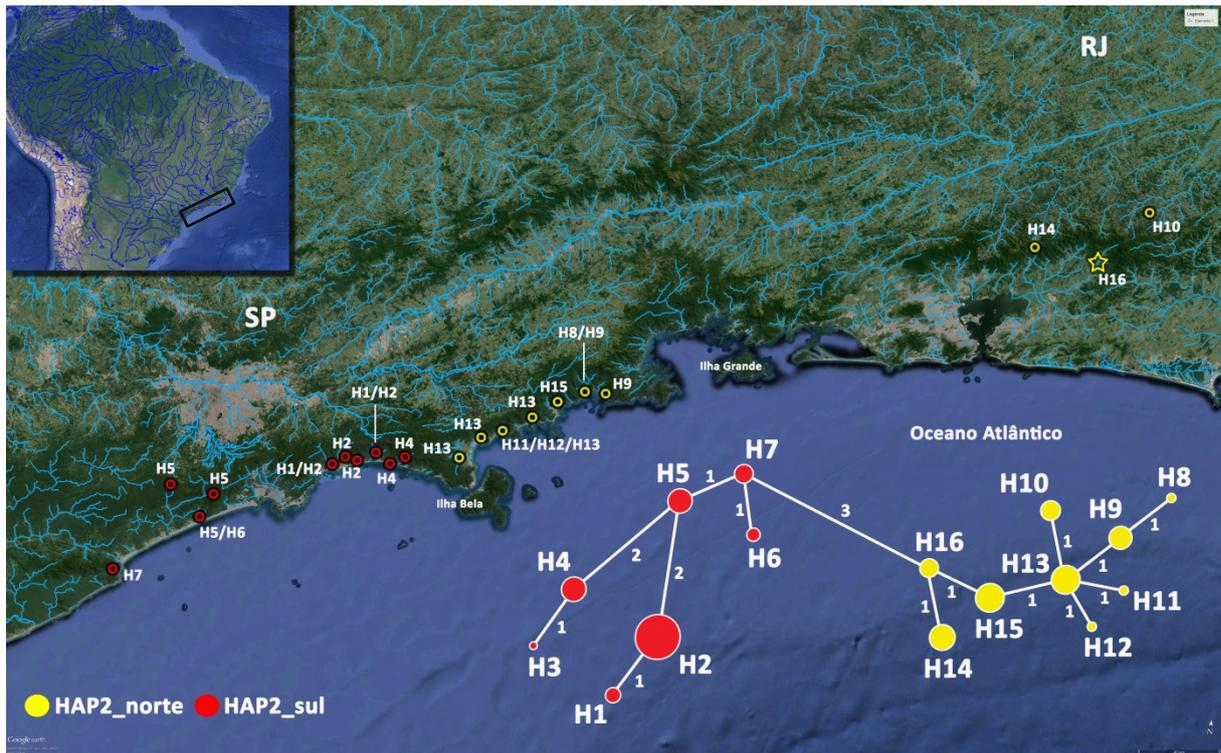
De acordo com as análises baseadas nos genes mitocondriais (IB e MV), este haplogrupo (HAP2) é um clado muito bem suportado (Fig. 1), formado por indivíduos pertencentes a populações de bacias costeiras dos estados do Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP) (Fig. 2), tendo como limite norte de distribuição a bacia do rio Paraíba do Sul, em Bom Jardim (RJ), e limite sul um riacho costeiro em Peruíbe (SP). Este haplogrupo, que possui o maior número de localidades amostradas (21), é definido como sendo *Mimagoniates microlepis sensu stricto*, uma vez que é nele que estão incluídas sequências de topótipos da espécie.

Ainda de acordo com as topologias baseadas nos genes mitocondriais, os indivíduos das bacias costeiras entre São Sebastião (limite norte) e Peruíbe (limite sul), ambas no Estado de São Paulo, formam um grupo monofilético bem suportado (Fig. 10). Através da análise de GMYC, este clado também foi recuperado como uma linhagem única, o HAP2\_sul, separada do HAP2\_norte, formado por representantes de bacias costeiras do Rio de Janeiro (limite norte) e São Paulo, até Caraguatatuba (limite sul) (Fig. 5). O HAP2\_norte, no entanto, não foi considerado um grupo monofilético mediante as análises filogenéticas. De acordo com as topologias, os topótipos de *M. microlepis* e parte dos indivíduos da bacia do rio Paraíba do Sul (coletados em Teresópolis – RJ) estariam mais relacionados ao HAP2\_sul da análise de GMYC (Fig. 10). As relações filogenéticas entre os espécimes do rio Paraíba do Sul (de Bom Jardim, RJ) e de drenagens costeiras de Ubatuba e Caraguatatuba (SP) não foram satisfatoriamente esclarecidas, uma vez que estes estão arrançados em uma politomia basal dentro do HAP2 (Fig. 10). Como já mencionado, a análise de *DNA Barcoding* indicou valores de divergência genética de 1% entre os HAP2\_norte e HAP2\_sul do GMYC. Quando considerado o HAP2 como um todo (108 exemplares), o valor de divergência genética interna é de 0,8%. Na análise filogenética baseada no RAG2, foram incluídos três espécimes do HAP2, um topótipo, um indivíduo da bacia do rio Paraíba do Sul (de Bom Jardim) e um da bacia do rio Itanhaém (SP). Como visto anteriormente, através da topologia nuclear, no entanto, a estruturação encontrada através dos genes mitocondriais não foi recuperada e estes indivíduos não formaram um grupo monofilético, sendo que o espécime do rio Itanhaém está mais relacionado a um do rio Ribeira de Iguape (HAP3) (Fig. 3).



**Figura 10.** Parte da topologia obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb) de *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, destacando o Haplogrupo 2. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente. Os haplótipos (H) correspondentes do gene COI (524 pb) também são indicados para cada indivíduo/grupo.

O HAP2 é composto por 16 haplótipos ocorrentes em 21 localidades (= pontos de coleta) (Fig. 11). A rede de haplótipos, baseada no gene mitocondrial COI, evidenciou uma estruturação marcante dentro deste haplogrupo, com a formação de dois filogrupos (norte e sul), separados por três passos mutacionais. Estes agrupamentos são os mesmos obtidos mediante a análise de GMYC: o filogrupo norte (i.e., HAP2\_norte), formado por nove haplótipos ocorrentes nas bacias dos rios Paraíba do Sul, Macacu (no RJ) e em drenagens costeiras de Ubatuba e Caraguatatuba (SP), e o filogrupo sul (i.e., HAP2\_sul), composto por sete haplótipos de bacias costeiras localizadas em São Sebastião, Bertioga, São Vicente, Mongaguá, Itanhaém e Peruíbe (SP). A rede de haplótipos neste último filogrupo indicou uma estruturação geográfica não evidenciada através das análises filogenéticas baseadas nos genes mitocondriais. No sentido norte-sul, localidades de São Sebastião e a localidade mais ao norte de Bertioga (Bertioga\_1) compartilham o haplótipo H4; já os pontos mais ao sul de Bertioga (localidades Bertioga\_2, Bertioga\_3 e Bertioga\_4) compartilham o H2 entre si; haplótipos são também compartilhados entre riachos que drenam São Vicente, Mongaguá e Itanhaém, e a localidade de Peruíbe (limite sul deste filogrupo) apresenta um haplótipo único e exclusivo (H7), que é o ponto de ligação entre este filogrupo e o filogrupo de distribuição mais ao norte. Dentro deste último, por sua vez, a estruturação é menos evidente, assim como indicado por meio das análises filogenéticas baseadas nos genes mitocondriais. Neste filogrupo, há um haplótipo central (H13), compartilhado por riachos de Caraguatatuba e pelo rio Escuro, localidade mais ao sul em Ubatuba; a maioria dos demais haplótipos está separada do H13 por apenas um passo mutacional; os riachos mais ao norte de Ubatuba (localidades Ubatuba\_1 e Ubatuba\_2) compartilham o haplótipo H9 entre si; a localidade Ubatuba\_3 tem um haplótipo único e exclusivo (H15). Cada uma das localidades amostradas na bacia do Paraíba do Sul apresenta um haplótipo único e exclusivo (H10 em um afluente do Paraíba na cidade de Bom Jardim e H14 em Teresópolis, ambas no RJ), que não possuem conexão direta (como também sugerido mediante as análises filogenéticas). Na localidade tipo, em Cachoeiras de Macacu, também só existe um haplótipo único e não compartilhado (H16), que é o ponto de conexão entre o filogrupo de distribuição mais ao norte e o de distribuição mais ao sul. O H16 não está ligado diretamente ao haplótipo central H13, e sim através do haplótipo H15 (da localidade Ubatuba\_3), de quem está separado por apenas um passo mutacional. O haplótipo da localidade de tipo também está ligado ao H14 (Paraíba do Sul\_2), de quem está separado por apenas um passo mutacional.



**Figura 11.** Distribuição do Haplogrupo 2 de *Mimagoniates microlepis* em bacias costeiras do Rio de Janeiro (inclui localidade tipo) e São Paulo e rede de haplótipos deste haplogrupo, inferida a partir de 524 pb do gene mitocondrial COI. Na rede, cada haplótipo é representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e o valor indicado nestas linhas corresponde ao número de mutações entre eles. No mapa, a estrela representa a localidade tipo de *M. microlepis*, na bacia do rio Macacu, em Cachoeiras de Macacu, RJ.

Com relação ao HAP2, foram realizadas duas análises de variância molecular (AMOVA). Na primeira, foram considerados como populações, os filogrupos norte e sul, obtidos a partir da rede de haplótipos. Já na segunda análise, cada localidade amostrada foi considerada como uma população distinta. Neste caso, como apresentado em ‘Material & Métodos’, só foram incluídas localidades com, no mínimo, dois indivíduos amostrados (no caso do HAP2, foram 19 localidades). Os resultados das duas análises de AMOVA são apresentados na Tabela 8 e indicam que o percentual de variação molecular é maior entre as localidades (populações) quando estas são consideradas individualmente e não por filogrupo. As estatísticas sumárias de cada uma destas localidades são apresentadas na Tabela 9. Das 19, apenas quatro apresentaram elevada diversidade haplotípica (i.e.,  $H_d > 0,5$ ): Ubatuba\_Caragua, São Sebastião\_1, Bertioaga\_1 e São Vicente. A diversidade nucleotídica foi considerada baixa em todas as localidades ( $\pi < 0,5\%$ ). Os resultados obtidos a partir da AMOVA indicaram elevado percentual de variação entre as localidades, evidenciando uma forte estruturação genética (Tabela 8).

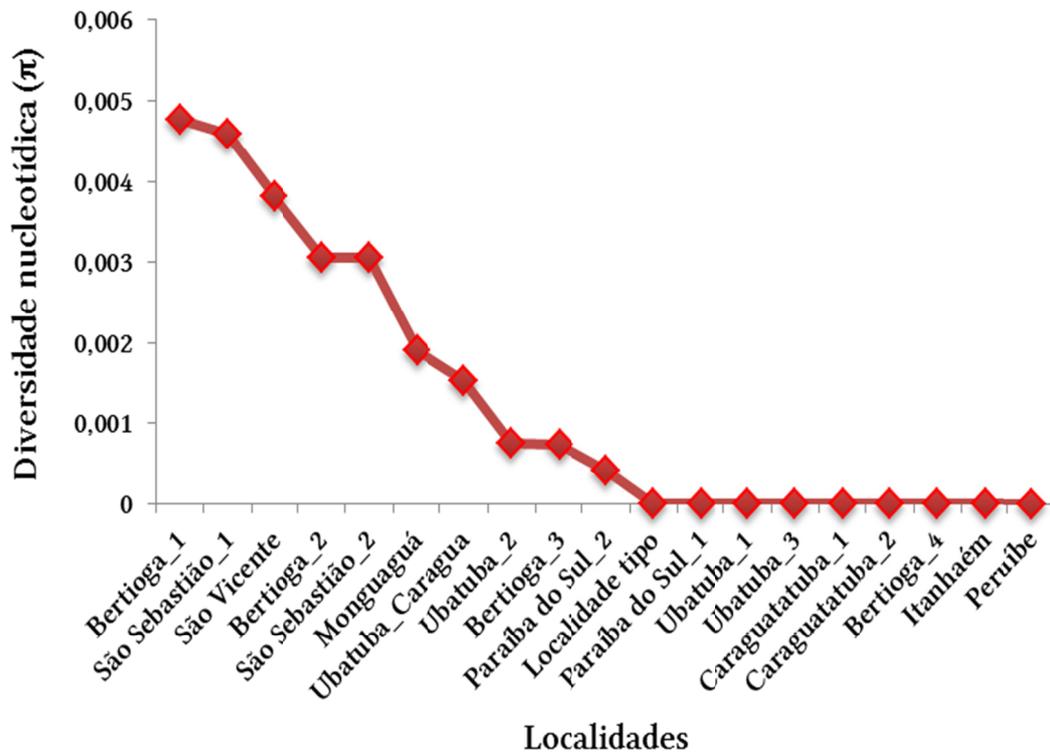
**Tabela 8.** Análise de variância molecular (AMOVA) do HAP2, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). Para a AMOVA 1, foram consideradas como populações o ‘filogrupo norte’ e ‘filogrupo sul’, obtidos a partir da rede de haplótipos; já na AMOVA 2, foram consideradas as 19 localidades distintas. GL: grau de liberdade; p=0,00000.

AMOVA	Níveis hierárquicos	GL	% de variação	Índice de fixação ( $F_{ST}$ )
1	Entre populações	1	55,25	0,55254
	Dentro de populações	106	44,75	
2	Entre populações	18	85,88	0,85876
	Dentro de populações	89	14,12	

**Tabela 9.** Estatísticas sumárias de cada localidade do HAP2, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). N: tamanho da amostra; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica por sítio; dp: desvio padrão.

Localidades	N	h	Hd/dp	$\pi$ /dp
Paraíba do Sul_1	5	1	0,000	0,00000
Localidade tipo	5	1	0,000	0,00000
Paraíba do Sul_2	9	2	0,222/0,166	0,00042/0,00032
Ubatuba_1	4	1	0,000	0,00000
Ubatuba_2	5	2	0,400/0,237	0,00076/0,00045
Ubatuba_3	10	1	0,000	0,00000
Ubatuba_Caragua	5	3	0,700/0,218	0,00153/0,00058
Caraguatatuba_1	2	1	0,000	0,00000
Caraguatatuba_2	5	1	0,000	0,00000
São Sebastião_1	5	2	0,600/0,175	0,00458/0,00134
São Sebastião_2	5	2	0,400/0,237	0,00305/0,00181
Bertioga_1	4	3	0,833/0,222	0,00477/0,00199
Bertioga_2	5	2	0,400/0,237	0,00305/0,00181
Bertioga_3	19	3	0,368/0,125	0,00074/0,00027
Bertioga_4	4	1	0,000	0,00000
São Vicente	3	3	1,000/0,272	0,00382/0,00134
Mongaguá	4	2	0,500/0,265	0,00191/0,00101
Itanhaém	4	1	0,000	0,00000
Peruíbe	5	1	0,000	0,00000

Como mencionado anteriormente, o teste de neutralidade D não evidenciou nenhum sinal de expansão demográfica relacionada ao HAP2 (Tabela 5). Já o outro teste desta natureza, o  $F_S$ , indicou uma possível expansão ( $F_S = -1,551$ ), mas sem suporte estatístico significativo ( $p=0,33$ ). O teste de mudança no tamanho populacional ( $R_2$ ) também indicou expansão (Tabela 5), que foi corroborada mediante a análise de BSP. Segundo esta análise, a expansão demográfica dentro HAP2 teve início por volta de 0,01 m.a. (Fig. 7a). Na Fig. 12 a seguir, é apresentado um gráfico indicando os valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) por localidade de coleta. A localidade com maior valor de  $\pi$  foi 'Bertioga\_1'.

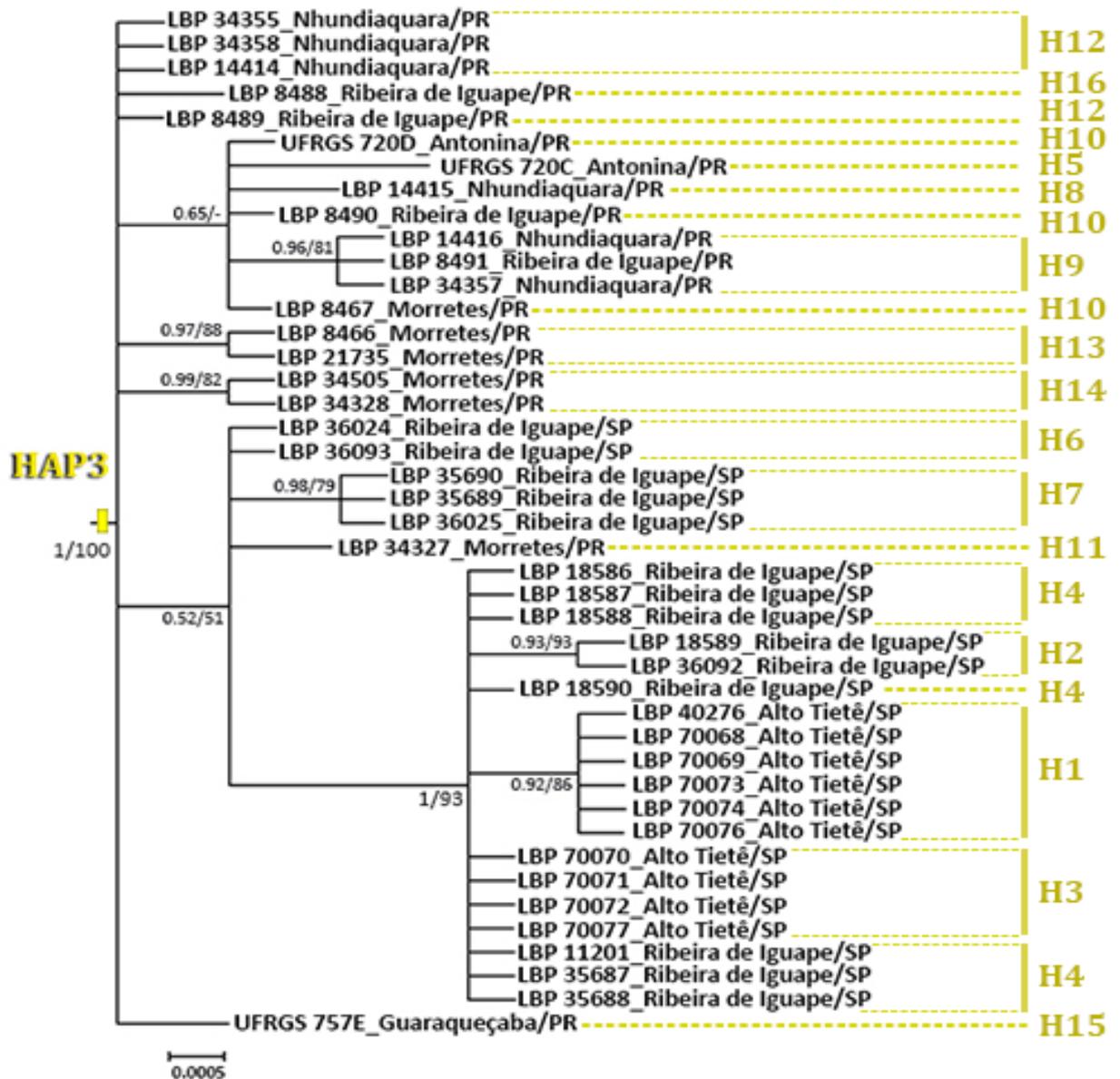


**Figura 12.** Gráfico indicando os valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) por localidade amostrada para o Haplogrupo 2 de *Mimagoniates microlepis*.

### **HAPLOGRUPO 3 – ALTO TIETÊ + RIBEIRA DE IGUAPE + LITORAL PR**

As análises filogenéticas (IB e MV) baseadas nos genes mitocondriais indicam que o haplogrupo 3 (HAP3) é um grupo monofilético, bem suportado (Fig. 1), formado por indivíduos pertencentes a populações das bacias do Alto Tietê (SP), Ribeira de Iguape (SP e PR) e drenagens costeiras do Estado do Paraná (PR) (Fig. 2). O limite norte de distribuição do HAP3 é o rio Alto Tietê, bacia do rio Paraná, na cidade de Itapeverica da Serra (SP), e o limite sul é um riacho costeiro, afluente da Baía de Paranaguá, em Morretes (PR).

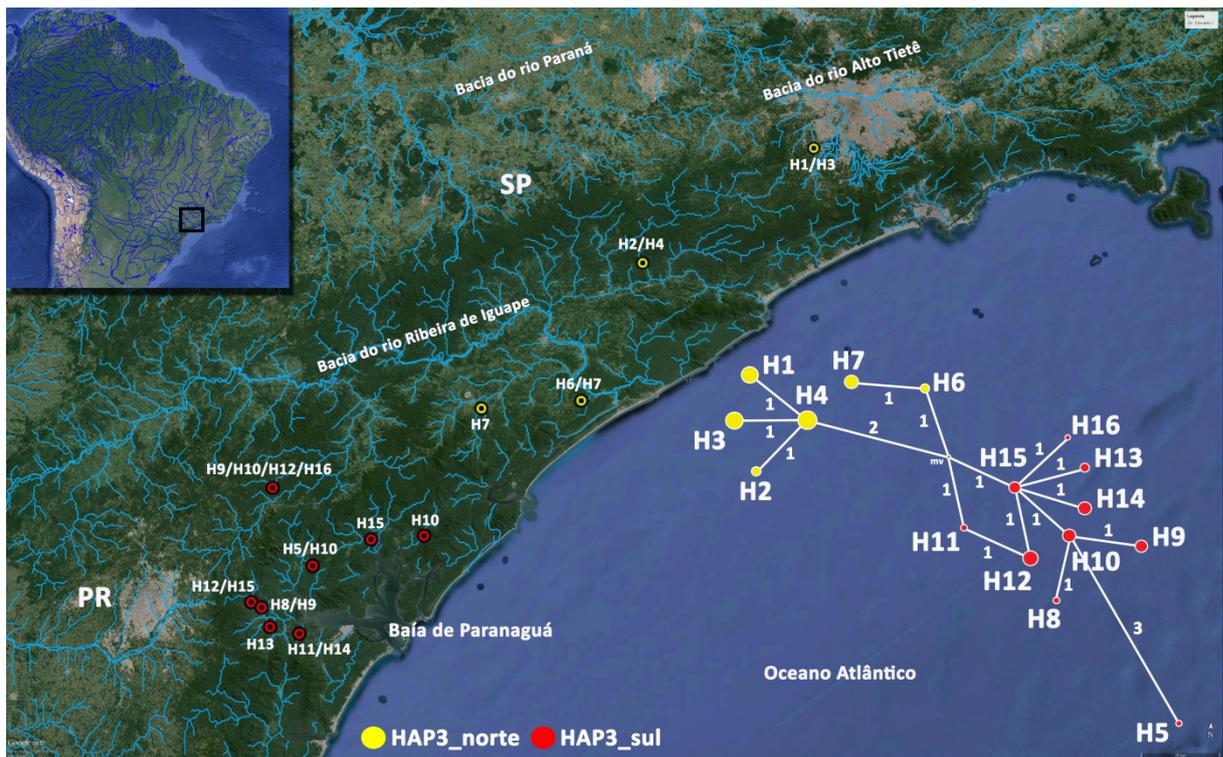
Ainda de acordo com as topologias baseadas nos genes mitocondriais, há um agrupamento bem suportado (probabilidade posterior de 1 e 93% de *bootstrap*) dentro do HAP3 composto pelos indivíduos do Alto Tietê e espécimes de algumas localidades da bacia do Ribeira de Iguape (Fig. 13). Se não fosse pela inclusão de um indivíduo (LBP 34327) de um riacho costeiro afluente da Baía de Paranaguá, em Morretes, as populações do Alto Tietê e de trechos mais baixos da bacia do Ribeira (que drenam o Estado de São Paulo) formariam um grupo monofilético, apesar do suporte não muito alto. Fora estas, não há indicativo de nenhuma outra estruturação interna para o HAP3: as diferentes populações de bacias costeiras do Paraná não formam um clado e indivíduos do Ribeira de Iguape, coletados no curso um pouco mais alto do rio, no Estado do Paraná, aparecem como mais proximamente relacionado aos espécimes destas bacias costeiras do que aos demais coletados no Ribeira (Fig. 13). A análise de GMYC também indica que o HAP3, como um todo, representa uma entidade única (Fig. 5). O valor de divergência genética interna, baseada na matriz do COI (53 indivíduos), é de 0,7%. Na análise filogenética baseada no gene nuclear, foram incluídos três espécimes do HAP3, um do Alto Tietê, um do Ribeira de Iguape e um de um riacho costeiro do Paraná. Como já mencionado, na topologia nuclear, no entanto, a estruturação encontrada através dos genes mitocondriais não foi recuperada e estes indivíduos não formaram um grupo monofilético; o espécime do rio Ribeira de Iguape está mais relacionado a um do rio Itanhaém (HAP2) (Fig. 3).



**Figura 13.** Parte da topologia obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb) de *Mimagoniates microlepis* e grupo externo, destacando o Haplogrupo 3. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente. Os haplótipos (H) correspondentes do gene COI (524 pb) também são indicados para cada indivíduo/grupo.

HAP3 é composto por 16 haplótipos ocorrentes em 12 localidades (= pontos de coleta) (Fig. 14). A rede de haplótipos, baseada no gene mitocondrial COI, evidenciou a presença de dois filogrupos dentro do HAP3: (1) filogrupo norte, que inclui haplótipos de distribuição mais ao norte, na bacia do Alto Tietê e em trechos do Ribeira de Iguape que drenam o Estado de São Paulo; (2) e o filogrupo sul, que é restrito ao limite sul de distribuição do HAP3, incluindo os haplótipos ocorrentes nas bacias costeiras do Paraná e no trecho do Ribeira de Iguape que drena este estado. Para a ligação entre estes grupos, foi necessária a adição de um vetor mediano (*median vector*, mv). Como será visto adiante, no entanto, mediante a análise de variância molecular (AMOVA) uma maior variação genética entre localidades foi recuperada,

quando estas foram consideradas de forma independente (por ponto de coleta) e não agrupadas por filogrupos (Tabela 10). No Alto Tietê, há dois haplótipos distintos e exclusivos desta localidade (H1 e H3). Na bacia do Ribeira de Iguape como um todo, há oito haplótipos, sendo que quatro deles (H2, H4, H6 e H7) ocorrem apenas em trechos mais baixos desta bacia, no Estado de São Paulo, e os outros quatro (H9, H10, H12 e H16) ocorrem na localidade Ribeira\_4, no Paraná. Os pontos amostrados em São Paulo (localidades Ribeira\_1, Ribeira\_2 e Ribeira\_3) compartilham haplótipos entre si, sendo que apenas a Ribeira\_2 possui um haplótipo exclusivo (H6). Dos quatro haplótipos que ocorrem na localidade Ribeira\_4, no Paraná, apenas um (H16) é exclusivo, sendo os demais compartilhados com duas ou mais localidades nas bacias costeiras localizadas ao entorno da Baía de Paranaguá. Todas estas localidades, por sua vez, compartilham haplótipos entre si, com exceção de Morretes\_2, que tem dois haplótipos (H11 e H14) exclusivos.



**Figura 14.** Distribuição do Haplogrupo 3 de *Mimagoniates microlepis* nas bacias do rio Alto Tietê (SP), Ribeira de Iguape (SP e PR) e em bacias costeiras do Paraná e rede de haplótipos deste haplogrupo, inferida a partir de 524 pb do gene mitocondrial COI. Na rede, cada haplótipo é representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e o valor indicado nestas linhas corresponde ao número de mutações entre eles. O HAP3\_norte e HAP3\_sul estão ligados por um vetor mediano (*median vector*, mv).

Com relação ao HAP3, foram realizadas três análises de variância molecular (AMOVA). Na primeira, foram considerados como populações, os filogrupos norte e sul, originados a partir da rede de haplótipos. Como o HAP3 é composto por indivíduos ocorrentes em bacias costeiras (como acontece tipicamente em *M. microlepis*) e também no Alto Tietê, que é afluente da bacia do rio Paraná, na segunda AMOVA, foram consideradas como populações, as localidades ‘Alto Tietê’ e ‘Costa’. Esta análise foi feita com o intuito de avaliar a existência de alguma estruturação/separação entre o Alto Tietê e as bacias costeiras não evidenciada na análise filogenética. Já na terceira análise, cada localidade amostrada foi considerada como uma população distinta. Neste caso, como apresentado no ‘Material & Métodos’, só foram incluídas localidades com, no mínimo, dois indivíduos amostrados (no caso do HAP3, foram 11 localidades). Os resultados das três AMOVAs são apresentados na Tabela 10 e indicam que o percentual de variação molecular é maior entre as localidades quando estas são consideradas separadamente, o que não justificaria a separação em ‘Filogrupo\_norte’ e ‘Filogrupo\_sul’, nem entre ‘Alto Tietê’ e ‘Costa’.

**Tabela 10.** Análises de variância molecular (AMOVA) do HAP3, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). Na AMOVA 1, foram consideradas como populações o ‘filogrupo norte’ e ‘filogrupo sul’, obtidos a partir da rede de haplótipos; na AMOVA 2, foram consideradas as localidades ‘Alto Tietê’ e ‘Costa;’ e já na AMOVA 3, foram consideradas 11 localidades distintas. GL: grau de liberdade; p=0,00000.

AMOVA	Níveis hierárquicos	GL	% de variação	Índice de fixação ( $F_{ST}$ )
1	Entre populações	1	52,87	0,52868
	Dentro de populações	51	47,13	
2	Entre populações	1	43,09	0,43093
	Dentro de populações	51	56,91	
3	Entre populações	10	58,42	0,58423
	Dentro de populações	42	41,58	

As estatísticas sumárias de cada uma das 11 localidades são apresentadas na Tabela 11. Todas as localidades apresentaram elevado valor de diversidade haplotípica (i.e.,  $H_d > 0,5$ ), com exceção das localidades Ribeira de Iguape\_1 e Morretes\_2 ( $H_d = 0,3$  e  $H_d = 0,4$ , respectivamente). A diversidade nucleotídica foi considerada baixa em quase todas as localidades ( $\pi < 0,5\%$ ), com exceção de Lageado e Nhundiaquara\_2 ( $\pi = 0,6\%$  aproximadamente, em ambas). Os resultados

da terceira AMOVA indicaram percentual de variação relativamente alto entre as localidades, indicando estruturação dentro do HAP3 (Tabela 10).

**Tabela 11.** Estatísticas sumárias de cada localidade do HAP3, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). N: tamanho da amostra; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica por sítio; dp: desvio padrão.

Localidades	N	h	Hd/dp	$\pi$ /dp
Alto Tietê	13	2	0,538/0,060	0,00206/0,00023
Ribeira de Iguape_1	6	2	0,333/0,215	0,00064/0,00041
Ribeira de Iguape_2	4	3	0,833/0,222	0,00477/0,00199
Ribeira de Iguape_3	5	2	0,600/0,175	0,00458/0,00134
Ribeira de Iguape_4	4	4	1,000/0,177	0,00413/0,00093
Lageado	2	2	1,000/0,500	0,00573/0,00286
Paranaguá	3	2	0,667/0,314	0,00136/0,00064
Nhundiaquara_1	5	3	0,700/0,218	0,00344/0,00116
Nhundiaquara_2	3	3	1,000/0,272	0,00636/0,00180
Morretes_1	3	2	0,667/0,314	0,00254/0,00120
Morretes_2	5	2	0,400/0,237	0,00229/0,00136

Os testes de neutralidade indicaram uma possível expansão demográfica em HAP3 ( $D=-0,32130$  e  $F_S=-4,032$ ), mas sem suporte estatístico significativo ( $p>0,10$  e  $p=0,46$ , respectivamente). O teste de mudança no tamanho populacional ( $R_2$ ) também indicou expansão (Tabela 5), desta vez com suporte ( $p=0,0000$ ). A análise de BSP, por outro lado, indicou um leve declínio no tamanho efetivo populacional, iniciado por volta de 0,01 m.a. (Fig. 7b). Um gráfico indicando os valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) por localidade de coleta é apresentado na Fig. 15. O maior valor de  $\pi$  foi encontrado na localidade 'Nhundiaquara\_2' e o menor no 'Ribeira\_1'.

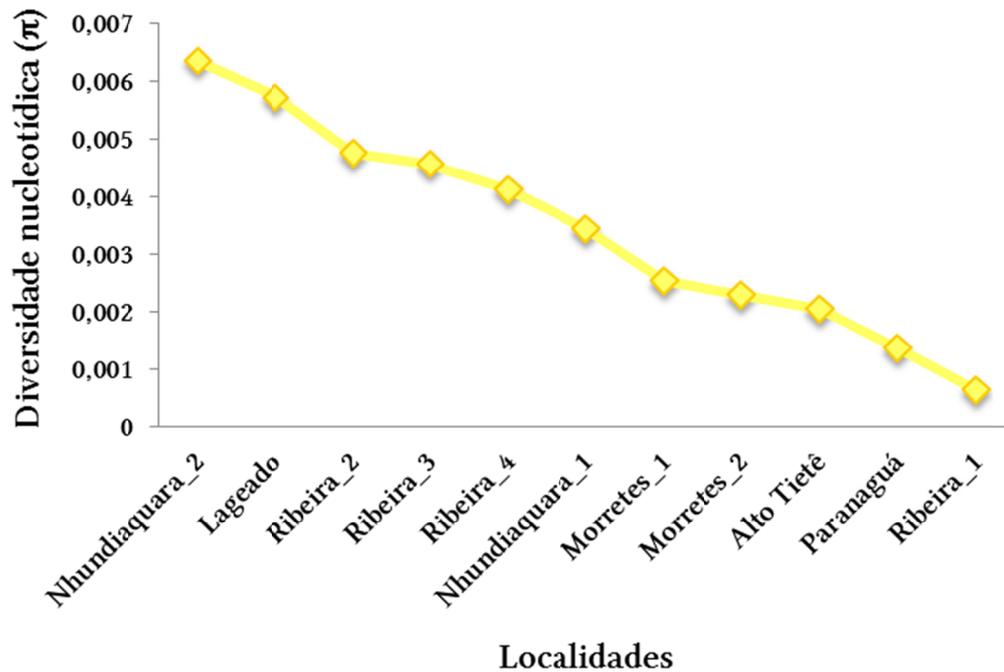


Figura 15. Gráfico indicando os valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) por localidade amostrada para o Haplogrupo 3 de *Mimagoniates microlepis*.

#### HAPLOGRUPO 4 – LITORAL (PR + SC + RS) + IGUAÇU + TIBAGI

De acordo com as análises baseadas nos genes mitocondriais (IB e MV), este grupo haplotípico (HAP4) forma um clado com elevado suporte (Fig. 1), composto por indivíduos pertencentes a populações de bacias costeiras dos estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS) (Fig. 2), além de populações das bacias dos rios Iguaçu (PR e SC) e Tibagi (PR), afluentes da bacia do rio Paraná. O limite norte de distribuição do grupo é a bacia do rio Iguaçu, em Curitiba (PR) e o limite sul, a drenagem costeira do rio Maquiné (bacia do Tramandaí), em Maquiné (RS). Como mencionado anteriormente, as topologias baseadas nos genes mitocondriais indicam que o HAP4 está mais relacionado a *Mimagoniates lateralis* do que aos demais haplogrupos de *M. microlepis*, formando com esta espécie um grupo monofilético bem suportado (Fig. 16).

Ainda de acordo com as topologias baseadas nos genes mitocondriais, dentro do HAP4, é possível distinguir dois agrupamentos, um deles, com elevado valor de suporte (1 de probabilidade posterior e 92% de *bootstrap*), é formado pelas populações das bacias dos rios Iguaçu e Tibagi e de drenagens costeiras do PR e SC; já o outro, que inclui populações ocorrentes nas bacias dos rios Mampituba (SC e RS) e Tramandaí (rios Maquiné e Três Forquilhas, ambos no RS), não foi muito bem suportado (0,54 de probabilidade posterior e 61%

de *bootstrap*). Em relação ao primeiro clado, as análises filogenéticas apontam para uma relação mais estreita entre os indivíduos coletados nas bacias dos rios Iguazu e Tibagi, mas as relações entre as bacias costeiras do PR e SC e destas com o clado (Iguazu, Tibagi) não foram satisfatoriamente esclarecidas. Ainda dentro deste agrupamento, alguns indivíduos aparecem como proximamente relacionados, mas sem a formação de clados distintos por localidade, uma vez que nem todos os espécimes do mesmo ponto de coleta estão incluídos nestes subgrupos (Fig. 16). Dentro do segundo agrupamento formado, há dois clados distintos, um é composto por indivíduos coletados apenas na drenagem do rio Maquiné (bacia do Tramandaí) e o outro pelos espécimes da bacia do rio Mampituba. Estes dois clados e o indivíduo coletado no rio Três Forquilhas (também bacia do rio Tramandaí, em Itati) estão arranjados em uma tricotomia basal.

Os dois grandes clados recuperados mediante as análises filogenéticas baseadas nos genes mitocondriais foram também reconhecidos através da análise de GMYC como entidades evolutivas distintas (HAP4\_norte e HAP4\_sul; Fig. 5). Os agrupamentos dentro de cada um destes clados mais abrangentes não foram reconhecidos como independentes por meio da análise de GMYC. Como já mencionado, a análise de *DNA Barcoding*, entretanto, indicou valores de divergência genética de apenas 2% entre os HAP4\_norte e HAP4\_sul do GMYC. Quando considerado o HAP4 como um todo (72 exemplares), o valor de divergência genética interna é de 1,1%. Na análise filogenética baseada no RAG2, foram incluídos três indivíduos do HAP4, um da bacia do rio Iguazu (PR) e dois de bacias costeiras distintas, uma no PR e outra em SC. Como já mencionado, este haplogrupo foi o único recuperado como monofilético através da análise com o gene nuclear e estes três indivíduos formaram um clado com elevado valor de suporte (Fig. 3).



O HAP4 é composto por 15 haplótipos ocorrentes em 18 localidades (= pontos de coleta) (Fig. 17). Através da rede de haplótipos, baseada no gene mitocondrial COI, foi recuperada a mesma estrutura observada na árvore de IB (Fig. 16), com distinção de dois grandes filogrupos dentro do HAP4: um de distribuição mais ao norte, incluindo as bacias dos rios Iguaçu, Tibagi e pequenas bacias costeiras dos estados de PR e SC e outro, de distribuição mais ao sul, nas bacias dos rios Mampituba (SC e RS), Três Forquilhas e Maquiné (ambos no RS) (Fig 17). Cada bacia deste último filogrupo tem apenas um haplótipo e exclusivo (H13, H15 e H14, respectivamente); o haplótipo do rio Três Forquilhas é central, separando-se dos haplótipos dos rios Mampituba e Maquiné por dois e um passos mutacionais, respectivamente. Em relação ao filogrupo de distribuição mais ao norte, algumas das relações internas, observadas na topologia apresentada na Fig. 16, foram também indicadas a partir da rede de haplótipos do COI (*e.g.*, H2 e H3; H4 e H5; H7; H8; H9). Dentro deste filogrupo, o haplótipo H12, ocorrente nas localidades ‘Guaratuba\_2’ e ‘Matinhos’, aparece como haplótipo central; a maioria dos demais haplótipos se separa deste por apenas um passo mutacional; todas as localidades das bacias dos rios Iguaçu e Tibagi apresentam e compartilham o mesmo haplótipo (H8); na localidade ‘Matinhos’, foi encontrado o maior número de haplótipos (5), sendo apenas dois deles exclusivos (H4 e H10); a maioria dos haplótipos é compartilhada entre duas ou mais localidades e, além de ‘Matinhos’, as únicas localidades que apresentam haplótipos exclusivos são ‘São Francisco do Sul’ (H1), ‘Garuva’ (H3), ‘Jaraguá’ (H6) e ‘Paranaguá\_HAP4’ (H11).

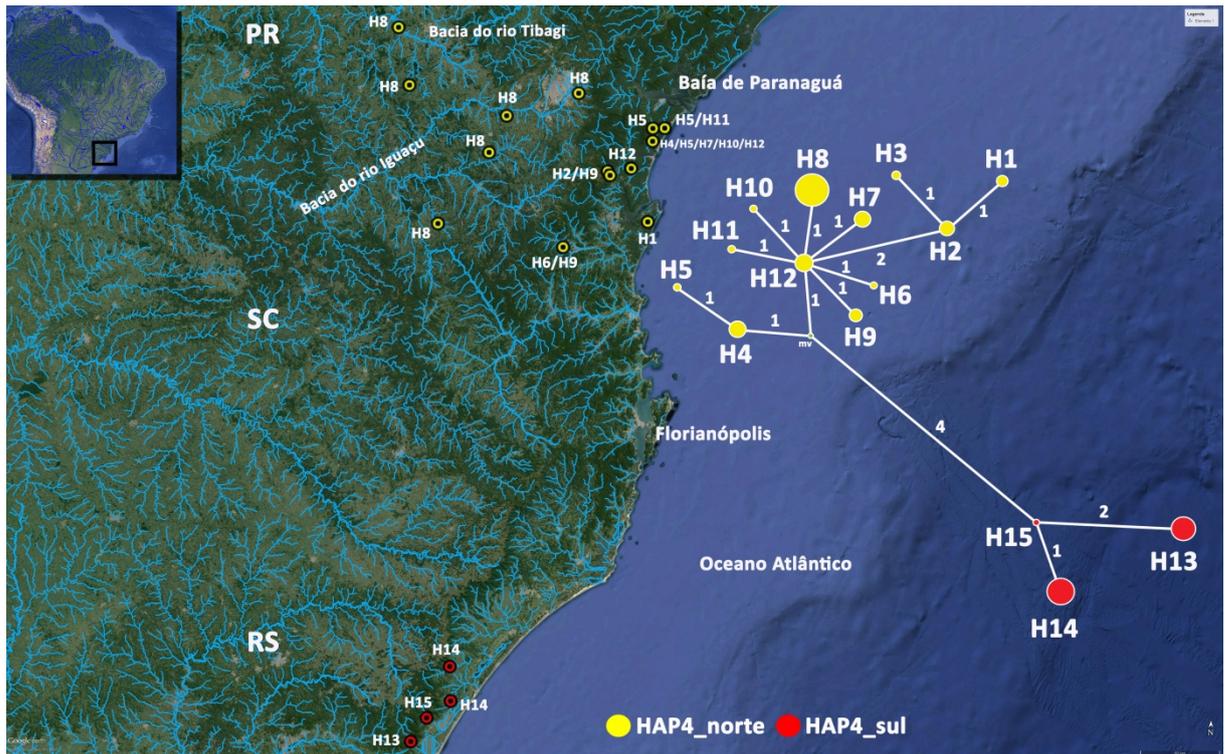


Figura 17. Distribuição do Haplogrupo 4 de *Mimagoniates microlepis* nas bacias do rio Tibagi, Iguaçu e em bacias costeiras de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e rede de haplótipos deste haplogrupo, inferida a partir de 524 pb do gene mitocondrial COI. Na rede, cada haplótipo é representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e o valor indicado nestas linhas corresponde ao número de mutações entre eles. O HAP4\_norte e HAP4\_sul estão ligados por um vetor mediano (*median vector*, mv).

Com relação ao HAP4, também foram realizadas três análises de variância molecular (AMOVA). Na primeira, foram considerados como populações, os filogrupos norte e sul, reconhecidos a partir da rede de haplótipos. Assim como o HAP3, o HAP4 também inclui indivíduos ocorrentes em drenagens costeiras (como acontece tipicamente em *M. microlepis*) e também em afluentes da bacia do rio Paraná (Iguaçu e Tibagi). Assim, na segunda AMOVA, foram consideradas como populações, as localidades, ‘Iguaçu\_Tibagi’ e ‘Costa’. Esta análise foi feita com o intuito de avaliar a existência de alguma estruturação/separação entre os rios Iguaçu e Tibagi e as bacias costeiras, não evidenciada na análise filogenética. Já na terceira análise, cada localidade amostrada foi considerada como uma população distinta. Neste caso, como apresentado em ‘Material & Métodos’, só foram incluídas localidades com, no mínimo, dois indivíduos amostrados (no caso do HAP4, foram 14 localidades). Os resultados das duas análises de AMOVA são apresentados na Tabela 12 e indicam que o percentual de variação molecular é ligeiramente maior entre as localidades quando estas são consideradas separadamente do que quando separadas por filogrupos. O percentual de variação entre as

populações quando separadas em ‘Iguaçu\_Tibagi’ vs. ‘Costa’ foi consideravelmente menor, o que não justifica esta separação.

**Tabela 12.** Análises de variância molecular (AMOVA) do HAP4, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). Na AMOVA 1, foram consideradas populações o ‘filogrupo norte’ e ‘filogrupo sul’, delineados a partir da rede de haplótipos; na AMOVA 2, foram consideradas apenas as localidades ‘Iguaçu\_Tibagi e ‘Costa’, e na AMOVA 3, foram consideradas considerou 14 localidades distintas. GL: grau de liberdade; p=0,00000.

AMOVA	Níveis hierárquicos	GL	% de variação	Índice de fixação ( $F_{ST}$ )
1	Entre populações	1	58,01	0,58006
	Dentro de populações	70	41,99	
2	Entre populações	1	23,20	0,23197
	Dentro de populações	70	76,80	
3	Entre populações	13	58,09	0,58086
	Dentro de populações	58	41,91	

As estatísticas sumárias de cada uma das 14 localidades são apresentadas na Tabela 13. Metade das localidades só apresentou um haplótipo, portanto, nenhum polimorfismo foi detectado. Das sete localidades restantes, apenas uma, Iguaçu\_2, apresentou baixo valor de diversidade haplotípica ( $H_d < 0,5$ ). A diversidade nucleotídica foi considerada baixa em quase todas as localidades ( $\pi < 0,5\%$ ), com exceção de Guaratuba\_1 ( $\pi = 0,9\%$ ) e Jaraguá ( $\pi = 0,6\%$ ) (Fig. 18). A diversidade nucleotídica nesta localidade foi a maior deste e de todos os demais haplogrupos. Os resultados da terceira AMOVA indicaram percentual de variação relativamente alto entre as localidades, indicando estruturação dentro do HAP4 (Tabela 12).

**Tabela 13.** Estatísticas sumárias de cada localidade do HAP4, com base no gene mitocondrial COI (524 pb). N: tamanho da amostra; h: número de haplótipos;  $H_d$ : diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica por sítio; dp: desvio padrão.

Localidades	N	h	$H_d/dp$	$\pi/dp$
São Francisco do Sul	2	1	0,000/0,00000	0,00000/0,00000
Garuva	6	3	0,733/0,155	0,00369/0,00099
Guaratuba_1	2	2	1,000/0,500	0,00954/0,00477
Guaratuba_2	5	1	0,000/0,00000	0,00000/0,00000
Matinhos	6	5	0,933/0,122	0,00433/0,00090

Paranaguá_HAP4	6	3	0,600/0,215	0,00331/0,00113
Jaraguá	2	2	1,000/0,500	0,00573/0,00286
Iguaçu_1	3	1	0,000/0,00000	0,00000/0,00000
Iguaçu_2	5	2	0,400/0,237	0,000084/0,00050
Iguaçu_3	5	1	0,000/0,00000	0,00000/0,00000
Tibagi_1	3	1	0,000/0,00000	0,00000/0,00000
Tibagi_2	4	1	0,000/0,00000	0,00000/0,00000
Maquiné	10	1	0,000/0,00000	0,00000/0,00000
Mampituba	12	2	0,530/0,076	0,00202/0,00029

Como mencionado anteriormente, o teste de neutralidade D não indicou nenhum sinal de expansão demográfica com relação ao HAP4 (Tabela 5). Já o outro teste desta natureza, o  $F_S$ , indicou uma possível expansão ( $F_S = -0,942$ ), mas sem suporte estatístico significativo ( $p=0,42$ ). O teste de mudança no tamanho da população ( $R_2$ ) indicou expansão demográfica significativa dentro do HAP4 (Tabela 5). Esta expansão, entretanto, não foi corroborada pela análise de BSP, que não evidenciou mudanças aparentes no tamanho efetivo populacional ao longo do tempo (Fig. 7d).

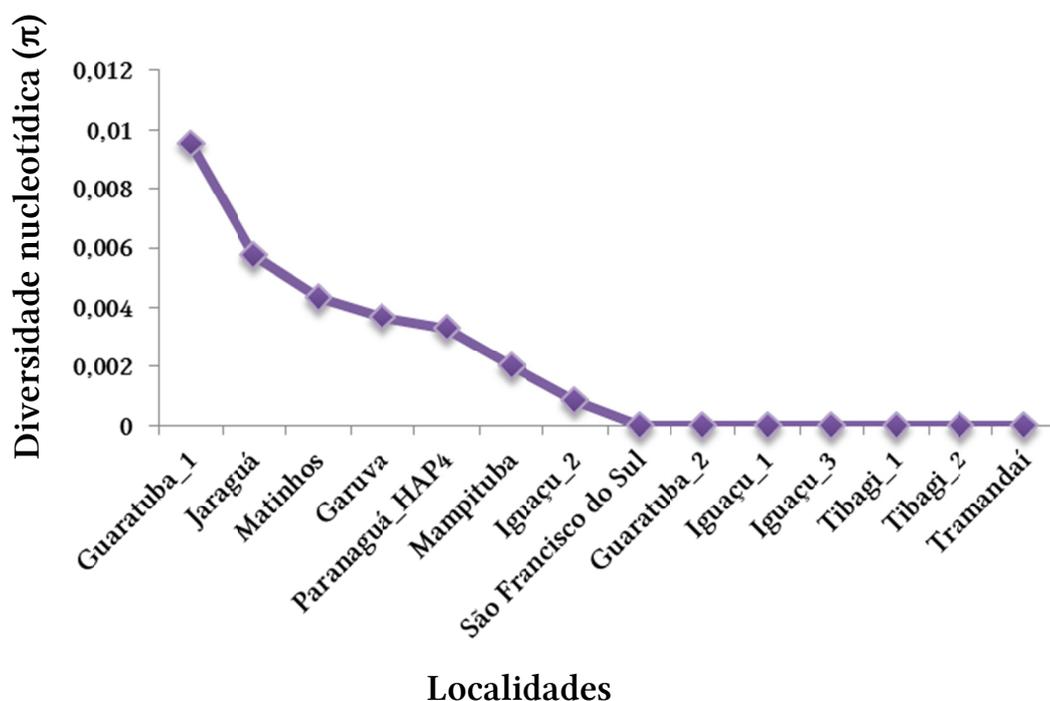


Figura 18. Gráfico indicando os valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) por localidade amostrada para o Haplogrupo 4 de *Mimagoniates microlepis*.

#### 4. Análises morfológicas

Análises morfológicas foram realizadas para avaliar se este conjunto de dados também sustenta a separação dos haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* em espécies distintas, como sugerido por algumas análises moleculares baseadas no mtDNA (e.g., GMYC, DNA barcoding). Os resultados das análises morfológicas também foram comparados aos apresentados por Menezes & Weitzman (2009) na tentativa de melhor compreender a variação clinal de alguns caracteres proposta por estes autores, desta vez com a inclusão de populações de *M. microlepis* não contempladas naquele trabalho (e.g., espécimes dos rios Alto Tietê, Tibagi, Pardo). Para efeito de comparação, portanto, as análises foram feitas por haplogrupo e buscou-se, sempre que possível, incluir os *vouchers* utilizados nas análises moleculares. Sobre a amostragem, também é importante ressaltar que o HAP4 foi o que teve o maior número de indivíduos analisados em virtude da relação (HAP4, *M. lateralis*). Os dados morfométricos são apresentadas na Tabela 14 e indicam sobreposição de valores tanto dos haplogrupos entre si quanto entre estes e *Mimagoniates microlepis sensu stricto* (i.e., lectótipo, paralectótipos e topótipos; ver Menezes & Weitzman, 2009: Tabela 12, página 357).

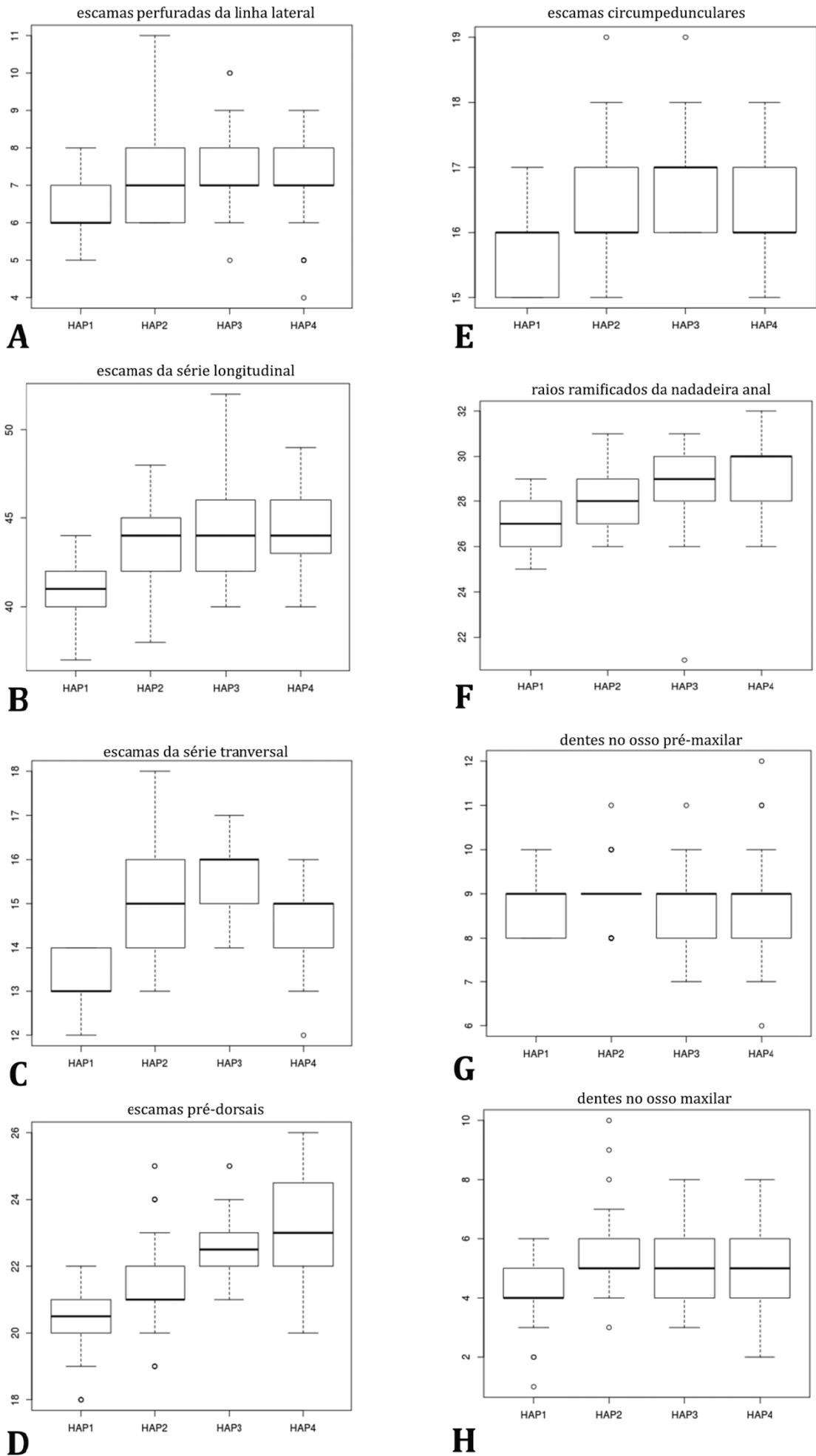
Os dados merísticos são apresentados qualitativa e comparativamente na Tabela 15, que inclui a amplitude de valores referentes a cada haplogrupo obtida no presente estudo, aquela apresentada por Menezes & Weitzman (2009), incluindo contagens do lectótipo da espécie, além da variação total de dados merísticos observada em *M. microlepis* (i.e., presente estudo e Menezes & Weitzman, 2009). Na Fig. 19, são apresentados os gráficos *BoxPlot*, gerados com base em alguns caracteres merísticos, onde é possível observar a simetria dos dados, sua dispersão e a existência de *outliers* (dados discrepantes). Estes gráficos também indicaram que, apesar de algumas tendências, não há variação clinal evidente com relação à maioria dos caracteres merísticos analisados. O padrão de colorido em álcool de cada um dos haplogrupos pode ser observado na Fig. 20 e também indica nenhuma diferença significativa. Um exemplar de *Mimagoniates lateralis* é apresentado na Fig. 21 para comparação com o HAP4. O padrão de colorido em vida da espécie é apresentado na Fig. 22, tendo como base um topótipo (Fig. 22a) e um exemplar do HAP1 (Fig. 22b). Detalhes adicionais em relação a caracteres morfológicos de *M. microlepis* são fornecidos na ‘Discussão’.

**Tabela 14.** Dados morfométricos dos quatro haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* propostos no presente estudo com base no mtDNA. N= número de espécimes examinados; DP = desvio padrão.

Machos	Haplogrupo 1					Haplogrupo 2					Haplogrupo 3					Haplogrupo 4				
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	13	19,9	35,4	27,9	-	4	39,5	44,7	42,2	-	10	30,8	44,1	36,2	-	43	27,2	52,5	39,6	-
<b>% do comprimento padrão</b>																				
Altura do corpo	13	24,1	30,2	26,8	1,5	4	30,5	32,0	31,2	0,6	10	28,1	33,5	30,3	1,7	38	27,8	35,6	31,1	2,0
Focinho-origem dorsal	13	59,9	64,2	62,0	1,5	4	56,8	61,5	59,6	2,0	10	61,2	63,8	62,4	0,9	41	59,7	67,4	62,8	1,6
Focinho-origem peitoral	13	24,6	28,1	26,1	0,9	4	24,1	26,1	25,2	1,0	10	25,6	27,2	26,6	0,5	43	23,2	28,3	26,2	1,1
Focinho-origem pélvica	13	42,7	46,4	45,1	1,1	4	40,6	45,1	42,8	2,5	10	44,7	48,3	46,0	1,1	43	42,2	49,1	45,0	1,4
Focinho-origem anal	13	56,0	60,3	58,0	1,1	3	56,5	59,7	57,9	1,7	10	56,3	63,2	58,8	2,3	43	54,0	61,2	57,6	1,8
Altura do pedúnculo caudal	13	11,2	15,0	13,4	1,0	3	13,2	14,1	13,5	0,5	10	12,5	15,6	14,2	0,9	43	10,8	16,7	14,0	1,4
Comprimento do pedúnculo caudal	13	7,5	11,4	9,2	1,1	4	8,3	10,2	9,2	0,8	10	7,6	11,6	9,5	1,1	43	6,7	10,4	9,1	0,8
Comprimento da peitoral	13	18,5	24,8	22,3	1,7	4	23,0	23,9	23,6	0,4	10	22,0	24,0	23,4	0,6	43	21,0	26,7	24,0	1,3
Comprimento da pélvica	13	13,5	15,8	14,5	0,7	4	11,6	15,4	13,7	1,6	10	13,6	16,0	14,9	0,7	43	10,8	15,3	13,7	1,0
Base da dorsal	13	12,0	16,7	14,0	1,2	4	14,2	16,5	15,4	1,0	10	13,2	16,0	14,2	0,8	43	12,0	16,2	13,9	1,1
Comprimento da dorsal	13	26,1	36,7	31,6	3,7	2	31,8	32,6	32,2	0,6	9	31,6	40,0	36,1	2,7	23	30,1	38,9	33,3	2,6
Base da anal	13	34,5	37,6	36,2	1,0	3	38,7	41,3	39,6	1,5	10	34,0	37,9	36,2	1,5	43	34,3	40,5	37,8	1,5
Comprimento da anal	13	16,0	19,9	18,5	1,2	4	17,9	20,0	19,0	0,9	10	17,5	19,7	18,7	0,7	43	16,1	22,8	19,4	1,5
Olho-origem dorsal	13	48,3	52,2	49,8	1,2	4	47,4	50,6	49,1	1,7	10	44,9	51,5	50,1	1,9	43	47,6	56,4	51,4	1,7
Origem dorsal-base caudal	13	37,9	42,2	40,6	1,0	4	42,8	44,6	43,6	0,8	10	36,5	41,6	40,2	1,5	43	36,0	48,8	41,0	2,0
Comprimento da cabeça	13	23,8	26,4	25,3	0,8	4	22,8	24,6	23,5	0,8	10	22,3	25,9	24,4	1,0	43	22,5	27,2	24,1	1,0
<b>% do comprimento da cabeça</b>																				
Diâmetro do olho	13	29,3	41,4	33,5	3,1	3	29,1	34,0	31,7	2,5	10	28,0	35,9	32,7	2,3	43	28,6	38,8	32,7	2,7
Comprimento do focinho	13	21,3	27,7	25,5	1,8	3	26,4	28,0	27,0	0,9	10	22,8	27,7	26,6	1,4	43	22,4	36,1	26,7	2,3
Espaço interorbital	13	32,0	40,0	35,4	2,2	4	33,6	39,2	35,9	2,6	10	33,0	36,8	34,7	1,3	43	31,5	38,7	35,0	1,7
Comprimento da maxila superior	13	42,3	50,0	45,9	2,3	3	43,6	49,0	46,1	2,7	10	41,0	47,1	44,4	1,8	43	38,9	49,4	44,5	2,1
Fêmeas ou Imaturos	Haplogrupo 1					Haplogrupo 2					Haplogrupo 3					Haplogrupo 4				
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	9	20,1	28,4	22,9	-	3	36,9	38,0	37,5	-	7	26,9	38,6	31,2	-	38	24,1	39,9	33,2	-
<b>% do comprimento padrão</b>																				
Altura do corpo	9	24,5	29,6	26,2	1,5	3	30,5	33,1	31,8	1,3	7	26,8	30,5	28,7	1,3	38	26,0	32,5	28,6	1,6
Focinho-origem dorsal	9	58,8	64,4	62,0	1,8	3	60,3	62,5	61,2	1,2	7	58,8	63,8	61,7	1,6	37	50,0	64,2	61,6	2,4
Focinho-origem peitoral	9	24,1	26,7	25,5	0,9	3	22,8	25,0	24,2	1,2	7	23,3	27,0	25,8	1,3	38	22,3	27,6	25,4	1,1
Focinho-origem pélvica	9	43,5	47,3	45,6	1,4	3	47,4	47,9	47,6	0,2	7	43,4	47,7	46,0	1,8	38	42,3	50,7	45,4	1,8
Focinho-origem anal	9	53,1	61,7	58,3	2,5	3	58,9	59,6	59,3	0,3	7	57,1	60,7	58,8	1,4	38	55,1	62,9	58,2	1,4
Altura do pedúnculo caudal	9	9,7	12,4	11,1	0,9	3	11,4	12,6	12,1	0,6	7	10,7	11,9	11,3	0,5	38	9,6	13,5	11,5	0,9
Comprimento do pedúnculo caudal	9	7,4	9,7	8,9	0,8	3	9,6	10,0	9,8	0,2	7	7,9	10,4	9,2	0,7	38	7,2	10,5	9,1	0,9
Comprimento da peitoral	9	20,8	24,4	21,8	1,2	3	22,6	23,6	23,1	0,5	7	21,0	25,7	23,5	1,5	38	21,3	26,1	23,8	1,1
Comprimento da pélvica	9	11,8	15,8	13,0	1,3	3	12,6	14,4	13,4	0,9	7	12,2	13,9	12,9	0,6	38	10,1	15,3	12,9	1,0
Base da dorsal	9	10,5	13,4	12,0	1,1	3	13,0	13,9	13,4	0,5	7	11,4	15,5	13,5	1,6	38	10,6	15,1	12,6	1,1
Comprimento da dorsal	9	19,3	25,0	21,6	2,1	3	25,3	26,8	26,0	0,8	6	19,7	25,6	22,3	2,3	38	16,8	27,7	22,8	2,6
Base da anal	9	32,5	35,8	34,1	1,2	3	35,5	36,0	35,7	0,3	7	33,2	40,1	36,7	2,3	38	34,9	39,3	37,5	1,1
Comprimento da anal	9	17,0	21,9	19,6	1,4	3	17,6	19,7	18,4	1,2	7	18,9	24,2	20,3	1,8	38	17,3	23,6	20,1	1,4
Olho-origem dorsal	9	46,5	52,1	49,4	1,8	3	49,3	51,1	50,1	0,9	7	47,4	51,5	50,2	1,5	38	46,8	52,6	50,5	1,2
Origem dorsal-base caudal	9	36,7	41,3	38,9	1,7	3	40,9	41,5	41,2	0,3	7	39,2	42,9	41,0	1,5	38	37,5	43,6	40,2	1,5
Comprimento da cabeça	9	23,6	26,4	25,2	1,0	3	23,7	24,7	24,2	0,5	7	23,1	24,6	23,9	0,6	38	21,1	25,5	23,4	1,0
<b>% do comprimento da cabeça</b>																				
Diâmetro do olho	9	31,8	37,3	35,4	1,9	3	32,2	33,7	32,7	0,8	7	32,6	40,9	36,1	2,9	38	30,7	41,0	35,9	2,3
Comprimento do focinho	9	21,2	26,7	24,3	2,0	3	25,8	27,0	26,5	0,6	7	22,9	30,3	25,7	2,5	38	20,7	29,3	26,0	2,1
Espaço interorbital	9	33,3	38,7	36,3	1,5	3	33,7	37,8	35,3	2,2	7	34,2	38,4	36,6	1,5	38	33,3	40,3	36,5	1,6
Comprimento da maxila superior	9	40,9	47,1	43,6	1,9	3	42,7	46,7	44,8	2,0	7	44,3	47,6	46,1	1,2	38	41,0	50,0	45,6	2,4

**Tabela 15.** Dados merísticos de *Mimagoniates microlepis*, incluindo a amplitude de valores referentes a cada haplogrupo obtida no presente estudo, aquela apresentada por Menezes & Weitzman (2009) para o lectótipo, paralectótipos e topótipos\*\* da espécie, além da variação total de dados. Contagens obtidas a partir de exemplares diafanizados e corados (d&c) são indicadas por \*: HAP1, 3 exs.; HAP2, 3 exs.; HAP3, 2 exs.; e HAP4, 7 exs..

Características	Presente estudo				Menezes & Weitzman (2009)		Variação total
	Haplogrupo 1	Haplogrupo 2	Haplogrupo 3	Haplogrupo 4	Rio Macacu**	LECTÓTIPO	
	33 exs.	54 exs.	65 exs.	96 exs.	42 exs.		290 exs.
Escamas perfuradas LL	5 a 8	6 a 11	5 a 10	4 a 9	6 a 9	6	4 a 11
Escamas linha longitudinal	36 a 44	38 a 48	40 a 52	40 a 49	40 a 46	43	36 a 52
Escamas série transversal	12 a 14	13 a 18	14 a 17	12 a 16	13 a 16	14	12 a 18
Escamas pré-dorsais	18 a 22	19 a 25	21 a 25	20 a 26	21 a 24	23	18 a 26
Escamas circumpedunculares	15 a 17	15 a 19	15 a 19	15 a 18	15 a 17	16	15 a 19
Raios ramificados anal	24 a 29	25 a 32	26 a 31	26 a 32	26 a 31	27	24 a 32
Raios dorsal	ii,8 ou ii,9	ii,8 ou ii,9	ii,8/iii,8/i,9	ii,7/ii,8/iii,8/ii,9	ii,8	ii,8	ii,7/ii,8/iii,8/i,9/ii,9
Raios peitoral	i,9 ou i,10	i,8/i,9/i,10/i,11	i,8/i,9/i,10/i,11	i,8/i,9/i,10/i,11	i,8/i,9/i,10/i,11	i,9	i,8/i,9/i,10/i,11
Raios pélvica	i,5/i,6/6/7	i,6/6/7/i,7	i,6/6/7	i,6/6/7/i,7	7	7	i,5/i,6/6/7/i,7
Dentes pré-maxilar	8 a 10	8 a 11	7 a 11	6 a 12	7 a 11	9	7 a 12
Dentes maxilar	1 a 6	3 a 10	3 a 8	2 a 8	3 a 7	5	1 a 10
Vértebras*	38 ou 39	38 ou 39	39	38 a 40	37 a 39	38	37 a 40
Raios branquiostegais*	4	4	4	4	4	sem dado	4
Supraneurais*	8 ou 9	8 ou 9	8	8 ou 9	sem dado	sem dado	8 ou 9



**Figura 19.** Gráficos *BoxPlot*, indicando a variação de alguns caracteres merísticos entre os quatro haplogrupos de *Mimagoniates microlepis* propostos no presente estudo. 102



**Figura 20.** Colorido em álcool de cada um dos haplogrupos de *Mimagoniates microlepis*, machos: (A) HAP1, MZUSP 93866, 35,4 mm CP (BA) e MZUSP 112829, 28,4 mm CP (ES). (B) HAP2, MZUSP 55290, 47,2 mm CP (Caraguatatuba) e MZUSP 114801, 41,6 mm CP (Peruíbe). (C) HAP3, MZUSP 115093, 28,6 mm CP (Alto Tietê) e MZUSP 62635, 48,3 mm CP (Ribeira de Iguape). (D) HAP4, MZUSP 40122, 44,2 mm CP (Iguaçu) e MZUSP 72853, 36 mm CP (Maquiné). Fotos: F. P. Dagosta & P. Camelier.



**Figura 21.** *Mimagoniates lateralis*, exemplar fixado, MZUSP 103970, macho, 25,6 mm CP, bacia do rio Itanhaém, São Paulo. Foto: P. Camelier.



Figura 22. Colorido em vida de *Mimagoniates microlepis*, machos: (A) MZUSP 118711, 32 mm CP, topótipo (HAP2). (B) MZUSP 112829, 27,3 mm CP, HAP1 (ES). Fotos: J. C. Nolasco e O. T. Oyakawa.

## 5. Discussão

### 5.1. Análises filogenéticas

#### 5.1.1. Árvores de genes: divergências entre marcadores mitocondrial e nuclear

Comparações entre as topologias obtidas através das análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança com base nos genes mitocondriais (16S e COI concatenados, 1059 pb) e nuclear (RAG2, 770 pb) de *Mimagoniates microlepis* e grupo externo revelaram incongruências em múltiplas escalas. A principal delas é que estas hipóteses diferiram em relação à proposta de monofiletismo de *M. microlepis*. Segundo as análises baseadas nos genes mitocondriais, *M. microlepis* não representa um grupo monofilético, visto que seu haplogrupo de distribuição mais ao sul (HAP4) está mais relacionado a *Mimagoniates lateralis* do que às demais populações de *M. microlepis* (i.e., haplogrupos 1, 2 e 3). Aqui, é importante ressaltar

que, apesar dos resultados não terem sido apresentados, as mesmas análises foram realizadas para cada um dos genes mitocondriais independentemente (16S, 537 pb e COI, 522 pb) e, em todas elas, a espécie *M. microlepis* aparece como não monofilética, em função do agrupamento (HAP4, *M. lateralis*). Os dados obtidos da análise do gene nuclear RAG2, por outro lado, possibilitaram recuperar o monofiletismo de *M. microlepis* em todas as análises filogenéticas. Como será discutido adiante, a árvore de espécies (*Species Tree*) e as análises morfológicas realizadas no presente estudo, também corroboram os resultados obtidos da análise do RAG2 e todos os haplogrupos propostos foram considerados como *M. microlepis*. A hipótese filogenética proposta para Glandulocaudini, baseada em dados mitocondriais e nuclear concatenados, apresentada no Capítulo 1 (Figs. 5-7), inclui representantes de todos estes haplogrupos. Segundo esta hipótese, *M. microlepis* também representa um grupo monofilético, como indicado pela análise do RAG2, mas com a forte estruturação sugerida pela análise dos genes mitocondriais.

Incongruências entre árvores de genes obtidas a partir de dados mitocondriais e nucleares são comuns em estudos filogenéticos e têm sido cada vez mais documentadas na literatura (*e.g.*, Moore, 1995; Avise, 2000; Shaw, 2002; Egger *et al.*, 2007; Ting *et al.*, 2008; Degnan & Rosenberg, 2009; Brunes *et al.*, 2010; Koblmüller *et al.*, 2010; Toews & Brelsford, 2012; Naidoo *et al.*, 2015; Akihito *et al.*, 2016), ao passo que, em virtude da natureza ligada do mtDNA, é esperado que diferentes genes mitocondriais apresentem hipóteses filogenéticas similares (Campos-Soto *et al.*, 2015), como ocorrido no presente estudo. Funk & Omland (2003) analisaram a ocorrência de parafiletismo em nível de espécie em diversos grupos animais e verificaram que este é um fenômeno relativamente comum, principalmente quando analisadas árvores de genes mitocondriais com um número grande de amostras. De acordo com os dados da literatura levantada por estes autores, o maior número de ocorrências de parafiletismo intra-específico foi obtido em invertebrados não-artrópodos e, entre os vertebrados, a maioria dos casos foi verificada em estudos com espécies de peixes, indicando que 24% das 370 espécies analisadas exibiram padrão de relação parafiletística ou polifilética entre os seus haplótipos. Incongruências topológicas entre dois marcadores moleculares e parafiletismo em nível de espécie pode estar associados tanto a processos metodológicos (*e.g.*, identificação errônea de *vouchers*, contaminação de DNA) quanto processos evolutivos. Dentre estes últimos, destacam-se os fenômenos de introgressão mitocondrial e separação incompleta de linhagens (*incomplete lineage sorting*) por retenção de polimorfismo ancestral, que são considerados como um dos principais responsáveis tanto pelas incongruências entre topologias nucleares e mitocondriais (Sota & Vogler, 2001; Ballard & Whitlock, 2004; Egger *et al.*, 2007; Ting *et al.*, 2008; Campos-

Soto *et al.*, 2015; Akihito *et al.*, 2016), quanto pelo parafiletismo do DNA mitocondrial de uma determinada espécie (Awise, 2000; Funk & Omland, 2003; Peters *et al.*, 2007).

O termo introgressão se refere ao movimento de genes entre espécies distintas ou entre populações geneticamente estruturadas de uma mesma espécie (Awise, 2004). O mtDNA é mais suscetível aos processos de introgressão do que o DNA nuclear (nDNA), sendo que, em muitos casos, o mtDNA de um táxon substitui completamente o do outro sem qualquer evidência de introgressão nuclear ou de modificação morfológica (Ballard & Whitlock, 2004; Bachtrog *et al.*, 2006; Nyingi & Agnèse, 2007). Uma vez ocorrida a introgressão, haplótipos da espécie em questão se assemelham mais aos de espécies distintas (no geral, simpátricas) do que aos de populações co-específicas (Morando *et al.*, 2004), e esta relação é evidenciada em genealogias baseadas no mtDNA. O fenômeno de separação incompleta de linhagens ocorre quando espécies ou populações ainda compartilham haplótipos gênicos oriundos da população ancestral (Awise, 2000; Funk & Omland, 2003). A ocorrência deste fenômeno é inversamente proporcional ao tempo de divergência entre as linhagens e diretamente proporcional ao tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ), de maneira que, quanto menor for o tempo de divergência e quanto maior for o  $N_e$ , mais polimorfismos ancestrais permanecerão segregando em populações descendentes após a separação (Funk & Omland, 2003). Assim, em casos de separação incompleta de linhagens, haplótipos (ou alelos) encontrados em uma espécie podem ser genealogicamente mais aparentados às linhagens haplotípicas de uma segunda espécie (McKay & Zink, 2010). Idiossincrasias do mtDNA (*e.g.*, haploidia, herança uniparental, geralmente materna) são responsáveis pelo menor  $N_e$  do *locus* mitocondrial em relação ao *locus* nuclear (cerca de um quarto), fazendo com que a separação completa entre as linhagens (e conseqüente perda de polimorfismos ancestrais) progrida de forma bem mais rápida no mtDNA (Awise *et al.*, 1987; Moore, 1995; Ting *et al.*, 2008). Assim, a separação incompleta de linhagens por retenção de polimorfismo ancestral é um fenômeno mais comum entre genes nucleares do que mitocondriais, apesar de ser possível ocorrer nestes (Funk & Omland, 2003; Toews & Brelsford, 2012).

Associar o parafiletismo de *M. microlepis* e a relação (HAP4, *M. lateralis*) à ocorrência de qualquer um dos fenômenos supracitados não é simples, visto que é esperado que a topologia resultante da introgressão mitocondrial seja bastante semelhante àquela esperada em situações de retenção de polimorfismo ancestral (Funk & Omland, 2003; Ballard & Whitlock, 2004; Morando *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2007). Além disto, os dois fenômenos já foram documentados em diferentes espécies de peixes (*e.g.*, Moran & Kornfield, 1993; Takahashi *et al.*, 2001; Nyingi & Agnèse, 2007; Egger *et al.*, 2007; Nevado *et al.*, 2009; Akihito *et al.*, 2016). No

entanto, apesar das dificuldades associadas, algumas abordagens permitem fazer inferências sobre a ocorrência destes fenômenos, e a comparação entre as topologias obtidas a partir do mtDNA e nDNA é uma das principais delas (Peters *et al.*, 2007; Toewls & Brelsford, 2012). Assim, apesar de não ser possível identificar de maneira precisa qual destes fenômenos seria responsável pela relação mais estreita entre o HAP4 de *M. microlepis* e *M. lateralis*, os resultados das análises filogenéticas baseadas no gene nuclear, nas quais *M. microlepis* aparece como monofilética, indicam que este pode ser um caso de introgressão mitocondrial. Além disso, alguns autores (*e.g.*, Naidoo *et al.*, 2015) sugerem que a combinação de “uma forte estruturação genética em genes mitocondriais e ausência de estruturação em genes nucleares”, como ocorrido no presente estudo, seja indicativo da ocorrência de introgressão mitocondrial. Para um melhor entendimento da questão, no entanto, o ideal seria obter sequências adicionais de marcadores nucleares de múltiplos *loci* (Peters *et al.*, 2007 e Koblmüller *et al.*, 2010), que sejam, preferencialmente, menos conservados que o RAG2, permitindo, assim, uma maior compreensão da história recente do grupo. Aqui, é importante ressaltar que, ainda assim, talvez não seja possível obter uma resposta conclusiva sobre qual dos dois fenômenos é responsável pela parafiletismo do mtDNA de *M. microlepis*, visto que, em muitos casos (a maioria deles em alguns grupos animais) é, de fato, impossível a distinção entre eles (Funk & Omland, 2003; Peters *et al.*, 2007; McKay & Zink, 2010).

Assumindo o fenômeno de introgressão como a melhor hipótese para explicar o parafiletismo de *M. microlepis* e a relação (HAP4, *M. lateralis*), alguns pontos são interessantes destacar. Em primeiro lugar, a reconstrução filogenética baseada nos genes mitocondriais sugere que a introgressão, caso tenha ocorrido, foi de maneira unidirecional, partindo de *M. lateralis* para o HAP4 de *M. microlepis*, pois, se tivesse ocorrido o inverso, o clado (HAP4, *M. lateralis*) estaria mais relacionado aos demais haplogrupos de *M. microlepis* e não a (*M. inequalis*, *M. rheocharis*), como proposto. Para que haja transferência interespecífica do mtDNA, é necessário que as espécies em questão mantenham (ou tenham mantido) contato direto, que possibilite o intercruzamento de fêmeas da espécie doadora com machos da espécie receptora. Assim, este é um fenômeno que acontece tipicamente entre espécies que ocorrem em simpatria ou espécies alopatricas que têm capacidade de dispersão e consequente manutenção de fluxo gênico (Peters *et al.*, 2007). Como *M. lateralis* e *M. microlepis* são peixes de água doce da divisão primária que habitam, preferencialmente, bacias costeiras completamente independentes, atualmente separadas por porções de terra ou pelo Oceano Atlântico, é improvável que o contato entre elas tenha se dado por dispersão. Durante o presente estudo, não foi analisado nenhum lote de *M. microlepis* que tenha sido coletado no mesmo ponto que

*M. lateralis*, mas a simpatria entre estas duas espécies foi registrada por Menezes *et al.* (2007). Segundo estes autores, apesar de *M. microlepis* ser mais comum em águas claras, a espécie pode ocorrer, mesmo que raramente, em águas pretas e em simpatria com *M. lateralis* (típica deste tipo de ambiente). Ainda sobre o local onde ocorreu a possível introgressão, é muito provável que tenha sido em riachos que drenam os estados do Paraná e/ou Santa Catarina, visto que, apesar de ambas ocorrerem no litoral de São Paulo, o haplogrupo de *M. microlepis* que se distribui neste último estado é o HAP2 e não o HAP4. Além disso, segundo Menezes & Weitzman (2009), foi em Santa Catarina que *M. microlepis* foi coletada em riachos de água escura, tipo de ambiente onde *M. lateralis* ocorre. Outra observação interessante é que, apesar de *M. lateralis* e o HAP4 de *M. microlepis* estarem relacionados filogeneticamente, não há compartilhamento de nenhum haplótipo entre eles, sugerindo que, caso tenha de fato ocorrido, a introgressão mitocondrial se deu há tempo suficiente para que o mtDNA destes grupos tenham atingindo o monofiletismo recíproco.

Além do contato direto entre as espécies, para que haja introgressão, é necessário que as fêmeas da espécie doadora sejam capazes de inter cruzar com machos da espécie receptora. Assim, pensando em um cenário atual, toda a complexidade associada à reprodução e estratégias reprodutivas de Glandulocaudini, em especial de *Mimagoniates* (*e.g.*, acentuado dimorfismo sexual, presença de escamas modificadas e tecido glandular na nadadeira caudal dos machos, provavelmente associados à produção e liberação de feromônio, reprodução com inseminação, ocorrência de elaborados comportamentos de corte e acasalamento, Nelson, 1964a, 1964b; Menezes & Weitzman, 2009; Azevedo *et al.*, 2016), pode representar um obstáculo ao cruzamento entre espécies distintas. No entanto, apesar de ainda serem necessários mais estudos, é provável que a fusão gamética entre os Glandulocaudini aconteça na água ou durante a desova (Burns *et al.*, 1995; Braga *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2016), o que cria um cenário favorável à ocorrência de introgressão, já que este fenômeno é mais comum em espécies de fertilização externa (Nevado *et al.*, 2009). A introgressão mitocondrial em peixes de água doce é bem documentada na família Cichlidae, ordem Perciformes (*e.g.*, Nyingi & Agnèse, 2007; D'Amato *et al.*, 2007; Egger *et al.*, 2007; Nevado *et al.*, 2009), e, apesar de menos comum, também há indícios/relatos na família Characidae (*e.g.*, Strecker *et al.*, 2003, 2004; Hausdorf *et al.*, 2011; Mazeti *et al.*, 2012). Em relação ao gênero *Mimagoniates*, é válido ressaltar que Menezes & Weitzman (1990) propuseram, com base em características anatômicas, a possível origem híbrida de *M. rheocharis*, que teria surgido por introgressão entre *M. inequalis* e *M. microlepis*, mas salientaram, entre outras coisas, a necessidade de estudos genéticos para corroborar ou refutar tal hipótese. Os resultados aqui obtidos, tanto

relacionados ao mtDNA quanto ao nDNA, não fornecem nenhum indício de que tenha ocorrido tal introgressão, de maneira que a hipótese de Menezes & Weitzman (1990) não parece geneticamente viável. Menezes & Weitzman (2009: 303) já haviam questionado a ocorrência de tal fenômeno, em virtude das diferenças morfológicas acentuadas dos caracteres sexuais secundários de *M. inequalis* e *M. microlepis*, que inviabilizariam o intercruzamento destas espécies. Ainda, segundo estes autores, diferenças relacionadas ao comportamento de corte destas duas espécies, pontuadas por Nelson (1964b), também dificultariam a ocorrência de introgressão.

As topologias mitocondrial e nuclear também foram incongruentes em relação à estruturação genética e formação de haplogrupos em *M. microlepis*, evidenciados somente pelo mtDNA. Nas análises filogenéticas baseadas no RAG2, apenas os indivíduos do HAP4 formaram um agrupamento. Segundo alguns autores, é relativamente comum espécies que apresentam alto grau de diferenciação populacional no mtDNA se mostrarem formadas por uma única população quando marcadores nucleares são analisados (*e.g.*, Castella *et al.*, 2001; Godinho *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2009; Rato *et al.*, 2015). Especificamente para o RAG2, sua eficiência como marcador capaz de detectar estruturação populacional é controversa; em estudos com morcegos, por exemplo, este gene indicou níveis relativamente altos de divergência e estruturação instraespecífica para a família Moormopidae (*e.g.*, Lewis-Oritt *et al.*, 2001), mas foi considerado inapropriado em estudos em nível de espécie em Phyllostomidae (*e.g.*, Martins *et al.*, 2009). Os resultados do presente estudo, quando comparado às informações da literatura também apontam para esta controvérsia. Apesar do número relativamente pequeno de amostras utilizadas, os resultados do presente estudo também indicam que o RAG2 não é um marcador muito eficiente para possibilitar a recuperação da estrutura populacional. Por outro lado, Pereira *et al.* (2012), ao analisarem populações de *Hoplias malabaricus* (Bloch) (12 indivíduos), espécie de peixe de água doce da família Erythrinidae, com base no gene mitocondrial ATPase-6 e no RAG2, encontraram estruturação populacional para o gene nuclear, apesar de em menor escala (três haplogrupos formados *vs.* quatro). Em peixes de água doce, de fato, a maioria dos estudos filogenéticos onde foi utilizado este gene, teve como foco a análise de relações entre ou dentro de táxons mais inclusivos (*e.g.*, Sullivan *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015b; Tagliacollo *et al.*, 2016).

Como mencionado anteriormente, peculiaridades do mtDNA fazem com que ele atinja o monofiletismo recíproco em menos tempo que o nDNA, especialmente entre populações com pouco ou nenhum fluxo gênico (Moore, 1995; Martins & Domingues, 2011), como aquelas analisadas no presente estudo. Além disso, em virtude do seu elevado  $N_e$  e das taxas de

mutação mais lentas, o nDNA está mais suscetível à separação incompleta de linhagens por retenção de polimorfismos ancestrais (Avise, 2000; Edwards & Beerli, 2000). Assim, o fato do RAG2 não ter recuperado os mesmos haplogrupos e estruturação propostos pelos genes mitocondriais em *M. microlepis* está dentro do esperado em análises que utilizam marcadores nucleares, como já descrito em diversos grupos animais (e.g., Cabanne *et al.*, 2008; Pinho *et al.*, 2008; Brunet *et al.*, 2010, 2015; Thomé *et al.*, 2010; Batalha-Filho & Miyaki, 2016). A ausência de monofiletismo recíproco em nDNA encontrada no presente estudo pode estar relacionada à retenção de polimorfismo ancestral por separação incompleta das linhagens ou ao longo tempo de coalescência deste DNA em relação ao mitocondrial. Aqui, vale a pena ressaltar que, apesar do RAG2 não ter sido muito informativo para avaliar a estruturação genética em *M. microlepis*, o uso deste gene foi imprescindível para discutir o parafiletismo do mtDNA da espécie. Estes resultados ratificam que a combinação de diferentes marcadores, de múltiplas regiões do genoma, possibilita uma melhor e mais completa compreensão da história evolutiva dos táxons, conforme já salientado por diversos autores (e.g., Funk & Omland, 2003; Ballard & Whitlock, 2004; Zink & Barrowclough, 2008; Degnan & Rosenberg, 2009; Toews & Brelsford, 2012; Davidson *et al.*, 2015).

Outra discordância entre as topologias baseadas nos genes mitocondriais e nuclear diz respeito à que espécie/clado *Mimagoniates microlepis* está mais relacionada. Desconsiderando aqui o HAP4, segundo os dados do mtDNA, *M. microlepis* está mais relacionada ao clado (*M. lateralis* (*M. inequalis*, *M. rheocharis*)), sendo este grupo irmão de *M. sylvicola*. Na hipótese obtida através da análise do gene nuclear RAG2, por sua vez, *M. microlepis* e *M. sylvicola* formam um grupo monofilético relacionado ao clado ((*M. lateralis*, *M. inequalis*) *M. rheocharis*). Representantes de Glandulocaudini já foram incluídos em inúmeras análises filogenéticas, tanto baseadas em dados morfológicos (e.g., Menezes & Weitzman, 1990, 2009; Menezes *et al.*, 2008; Mirande, 2010) quanto moleculares (e.g., Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015b). Apesar de todas estas incluírem *M. microlepis*, em poucas foram analisadas mais de duas outras espécies do gênero, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com aqueles disponíveis na literatura. Nas primeiras hipóteses baseadas em dados morfológicos, que tiveram como foco os glandulocaudíneos e incluíram quase todas ou todas as espécies de *Mimagoniates* (i.e., Menezes & Weitzman, 1990 e Menezes *et al.*, 2008, respectivamente), *M. microlepis* aparece como grupo irmão de *M. rheocharis*. Na hipótese morfológica mais atual (i.e., Menezes & Weitzman, 2009), entretanto, não fica esclarecido satisfatoriamente que espécie ou clado estaria mais relacionado a *M. microlepis*, visto que esta espécie está posicionada em uma politomia junto com *M.*

*lateralis*, *M. rheocharis* e *M. sylvicola*. Das reconstruções filogenéticas baseadas em dados moleculares, apenas as de Javonillo *et al.* (2010), relativa à família Characidae, e Thomaz *et al.* (2015b), abordando a subfamília Stevardiinae, incluíram mais de duas espécies de *Mimagoniates*, apesar do número reduzido de amostras. As topologias apresentadas em ambos os trabalhos foram baseadas na matriz de dados concatenados, incluindo tanto genes mitocondriais quanto nucleares, mas, em nenhum deles, foram analisadas amostras de *M. sylvicola*. Segundo Javonillo *et al.* (2010), a espécie irmã de *M. microlepis* é *M. lateralis* e este clado é grupo irmão de (*M. inequalis*, *M. rheocharis*). Aqui, vale a pena ressaltar que, na topologia apresentada por estes autores (Javonillo *et al.*, 2010: Fig. 5, página 506), *M. microlepis* aparece relacionada a *Mimagoniates* sp., mas o *voucher* desta última espécie foi analisado e trata-se de um outro indivíduo de *M. microlepis*. Já Thomaz *et al.* (2015b) incluíram apenas três espécies de *Mimagoniates* e obteve a seguinte hipótese de relação (*M. microlepis* (*M. inequalis*, *M. rheocharis*)). Segundo a topologia baseada em dados mitocondriais e nuclear concatenados e apresentada no Capítulo 1 desta tese (Figs. 5-7), *M. microlepis* é grupo irmão de *M. sylvicola*, conforme sugerido aqui pela análise nuclear. Em virtude das incongruências obtidas no presente estudo e em análises prévias, para um melhor entendimento da relação entre *M. microlepis* e suas congêneres, sugere-se a realização de uma análise de evidência total ampla, que inclua um número maior de caracteres morfológicos do que aqueles utilizados em estudos anteriores, bem como um maior número de genes do que os utilizados tanto no presente trabalho, quanto em anteriores.

### **5.1.2. Árvore de espécies (*Species Tree*): combinação entre marcadores mitocondrial e nuclear**

A árvore de espécies gerada por meio do \*BEAST também sugere que *M. microlepis* seja monofilética, mas o baixo valor de suporte (0,77 de probabilidade posterior) e as inconsistências entre as diferentes topologias, evidenciadas no *cloudogram* gerado no DensiTree, apontam para a necessidade de incluir mais marcadores nucleares, que possuam, preferencialmente, evolução mais rápida que o RAG2. Ainda, apesar do resultado obtido, algumas ressalvas sobre a utilização da análise feita através do \*BEAST para recuperar o monofiletismo de *M. microlepis* se fazem necessárias. A estimativa de árvore de espécie foi realizada sob uma abordagem bayesiana, denominada coalescência de múltiplas espécies (Heled & Drummond, 2010), que não leva em consideração a existência de transferência horizontal, introgressão ou hibridização entre os indivíduos das espécies investigadas. Assim,

caso tenha havido introgressão mitocondrial entre o HAP4 de *M. microlepis* e *M. lateralis*, este método pode não ser o mais indicado para discutir o monofiletismo da espécie. Outra forma de propor hipóteses de árvores de espécies, que também é a mais comum apesar de não ser, necessariamente, a mais indicada, é gera-las a partir de uma matriz única, obtida pela concatenação de dados mitocondriais e nucleares (Rokas *et al.*, 2003; Gadagkar *et al.*, 2005; Degnan & Rosenberg, 2006; Kubatko & Degnan, 2007; Edwards *et al.*, 2007). No Capítulo 1 desta tese, esta abordagem foi utilizada, mesmo que com outros objetivos, e corroborou tanto a hipótese de monofiletismo de *M. microlepis* (0,94 de probabilidade posterior), quanto a de estruturação dentro da espécie (Capítulo 1, Fig. 7). Os resultados obtidos através do \*BEAST também apontaram para a forte estruturação em *M. microlepis*, com a formação de quatro filogrupos distintos. Assim, a árvore de espécies, gerada no presente trabalho por meio de uma abordagem bayesiana de coalescência de múltiplas espécies, mostrou-se congruente àquela gerada pelo método tradicional de concatenação apresentado no Capítulo 1. Resultados similares foram obtidos para outros grupos de vertebrados, tais como anfíbios (*e.g.*, Bruner *et al.*, 2010) e aves (*e.g.*, Lavinia *et al.*, 2015).

## **5.2. Análises de GMYC e DNA *barcoding*: implicações na taxonomia e conservação de *Mimagoniates microlepis***

Espécies são consideradas como unidades fundamentais da biologia, de maneira que o melhor entendimento dos processos e mecanismos que levaram ao surgimento delas (*i.e.*, especiação) bem como o estabelecimento de métodos para sua delimitação de forma clara e objetiva são de suma importância e dependem da conexão entre disciplinas que permeiam as áreas da micro e macroevolução, tais como sistemática, genética, morfologia, biologia reprodutiva, comportamento, paleontologia e fisiologia (Cracraft, 1983; de Queiroz, 1998, 2007; Avise, 2000, 2004; Sites & Marshall, 2003; Rato *et al.*, 2015). Justamente por ter um papel fundamental em quase todas as áreas das ciências biológicas, a definição de espécies não é trivial e, certamente, seu conceito é um dos mais controversos e também um dos temas mais discutidos na biologia há anos. Mayden (1997), por exemplo, revisou o assunto e apresentou uma lista de 24 conceitos diferentes, que eram utilizados naquela época para definir espécie. O tema foi vastamente discutido por autores diversos antes e depois dele (*e.g.*, Mayr, 1957; Cracraft, 1983, 2002; Bock, 1986; Coyne *et al.*, 1988; de Queiroz, 1998, 2007; Avise, 2000, 2004; Sites & Marshall, 2003; Hallet, 2007). Segundo Cracraft (2002), “O que é espécie?” é uma das sete grandes questões em sistemática biológica e, apesar de passados mais de 10 anos, esta

afirmação ainda é válida atualmente. Dada a complexidade do que seria uma espécie, independente do conceito utilizado, bem como de todo o processo de especiação, é esperado toda a discussão e divergências sobre o tema. De acordo com de Queiroz (2007), as divergências sobre o conceito teórico de espécies estão intimamente ligadas ao problema de delimitá-las, ou seja, a forma como se determina os limites e os números de espécies a partir de dados empíricos.

Tradicionalmente, espécies são descritas e identificadas utilizando características morfológicas, sejam elas tipológicas ou quantitativas, e estas características são consideradas por diversos autores como linhas de evidências essenciais e suficientes para o reconhecimento de uma espécie (Bauer, 2011; Ahmadzadeh *et al.*, 2013). Para outros autores, entretanto, uma série de fatores (*e.g.*, pressão seletiva, condições ambientais similares) pode fazer com que caracteres morfológicos de espécies distintas sejam convergentes, de maneira que apenas o uso da morfologia pode subestimar, em alguns casos, o número de espécies e, em especial, pode falhar no reconhecimento de espécies crípticas (Nevo, 2001; Bickford *et al.*, 2007 Rato *et al.*, 2015). Com a aquisição e aprimoramento das técnicas moleculares, cada vez mais dados genéticos têm sido utilizados na investigação da história evolutiva dos táxons e eles têm gerado uma grande quantidade de informações interessantes, que têm sido utilizadas para complementar os estudos morfológicos e auxiliar na elucidação de questões taxonômicas (*e.g.*, Melo *et al.*, 2011; Kekkonen & Hebert, 2014; Costa-Silva *et al.*, 2015; Rato *et al.*, 2015; Roxo *et al.*, 2015). Assim, o uso de dados morfológicos e moleculares em conjunto tem sido cada vez mais recomendado em estudos de sistemática, incluindo aqueles de taxonomia alfa (Bickford *et al.*, 2007; Ahmadzadeh *et al.*, 2013).

Com o objetivo de melhor compreender a história evolutiva de *M. microlepis*, bem como a estruturação sugerida por meio da filogenia mitocondrial, foram aplicados, no presente estudo, dois métodos de identificação molecular de espécie, o clássico e mais tradicional *DNA barcoding* e o GMYC, e ambos indicaram que *M. microlepis* pode ser um nome utilizado para abrigar mais de uma espécie. Desde que foi proposto por Hebert *et al.* (2003), a eficiência do *DNA barcoding* tem sido testada tanto na identificação de espécies de peixes marinhos (*e.g.*, Ward *et al.*, 2005) quanto de água doce (Hubert *et al.*, 2008; Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011), com taxas de sucesso em torno de 90%. Como mencionado na seção ‘Material e Métodos’, geralmente, os pesquisadores que utilizam a ferramenta de *DNA barcoding* estabelecem uma divergência genética de 2% como valor limite para delimitação de espécies (*e.g.*, Hubert *et al.*, 2008; Ward, 2009; Carvalho *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011). As divergências genéticas dos diferentes haplogrupos de *M. microlepis* variaram

entre 5% e 9% e estes são valores consideravelmente altos quando comparados com aqueles registrados na literatura. Em estudos com diversas ordens, famílias e gêneros de peixes, muitos autores sugerem que valores de divergência genética intraespecífica acima de 2% sejam, de fato, elevados e poderiam sinalizar espécies crípticas e/ou possíveis novas espécies dentro do grupo analisado (e.g., Ward *et al.*, 2009; Valdez-Moreno *et al.*, 2009, April *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013). Em alguns trabalhos recentes sobre a ictiofauna de água doce Neotropical nos quais foi utilizada a ferramenta do *DNA barcoding* (e.g., Carvalho *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013), os autores encontraram valores de divergência genética interespecífica menores que 2%. Estas variações indicam quanto o estabelecimento do valor de 2% pode ser arbitrário e, aqui, é importante ressaltar que estes números representam valores médios encontrados em alguns estudos realizados, e que devem ser levados em consideração cautelosamente antes da tomada de decisões taxonômicas, uma vez que os organismos evoluem de maneira distinta. Além disso, especialmente em táxons amplamente distribuídos, com pouca capacidade de dispersão e pouco ou nenhum fluxo gênico, como é o caso de *M. microlepis*, a extinção de haplótipos intermediários também pode contribuir para o aparecimento de divergências genéticas pronunciadas entre as diferentes populações (Avice, 2000). Assim, os valores encontrados através do método de *DNA barcoding* podem também ser reflexo da estruturação populacional encontrada em *M. microlepis* (com base nos genes mitocondriais) e não, necessariamente, um indicativo de que há mais de uma espécie sob este nome.

Recentemente, métodos estatísticos mais aprimorados vêm sendo empregados às análises clássicas de *DNA barcoding* na tentativa de estabelecer limites de espécies ou de evidenciar Unidades Evolutivas Independentes (UEIs). Dentre estes, destaca-se o método de GMYC (Pons *et al.*, 2006; Fontaneto *et al.*, 2007), que busca identificar a fronteira entre divergência inter/intraespecíficas através de uma quebra na taxa de cladogênese de uma árvore filogenética que contenha múltiplas populações e múltiplas espécies (Reid & Carstens, 2012; Fujisawa & Barraclough, 2013; Roxo *et al.*, 2015). Como já mencionado, na análise de GMYC foram recuperados os quatro haplogrupos de *M. microlepis* como linhagens distintas, inclusive com maior estruturação e subdivisão do que aquelas indicadas por meio de análises filogenéticas e do *DNA barcoding*. Este resultado está dentro do esperado, pois, segundo alguns autores (e.g., Talavera *et al.*, 2013; Kekkonen *et al.*, 2014), apesar do GMYC ter uma base teórica forte, este método, geralmente, reconhece mais Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) do que outros. Apesar dos resultados do GMYC indicarem a existência de, pelo menos, quatro linhagens distintas em *M. microlepis* (i.e., os quatro haplogrupos) e

estas possuírem elevada divergência genética entre si (indicada pelo *DNA barcoding*), pode ser que isto seja resultado da acumulação de mutações ao longo do tempo e estes haplogrupos podem não se tratar, necessariamente, de espécies distintas. Este cenário é comum em táxons cujas diferentes populações estão isoladas geograficamente (Bickford *et al.*, 2007), como no caso de *M. microlepis*, e é um resultado que já foi encontrado na literatura para outros grupos de peixes (*e.g.*, Costa-Silva *et al.*, 2015).

Como será discutido em detalhes adiante e como já apresentado por Menezes & Weitzman (2009), apesar de terem sido encontradas algumas diferenças morfológicas entre os quatro haplogrupos de *M. microlepis*, estas não foram consideradas suficientes para reconhecê-los como espécies distintas, em virtude da sobreposição de caracteres. Apesar de não ser a única explicação possível e das ressalvas supracitadas, os valores de divergência genética, estimados para os diferentes haplogrupos de *M. microlepis* (entre 5% e 9%), aliados aos resultados do GMYC e aos resultados dos estudos morfológicos fornecem indícios de que esta seja uma espécie seja representada por um conjunto de populações (= haplogrupos), que poderiam ser caracterizadas como espécies crípticas. Isto significa que, segundo estas análises, o nome *M. microlepis* pode abrigar duas ou mais espécies, que são morfológicamente indistinguíveis (Bickford *et al.*, 2007). Os resultados encontrados em *M. microlepis* (*i.e.*, discrepâncias entre dados morfológicos e moleculares) é relativamente comum e há muitos casos relatados na literatura, inclusive em peixes de água doce (*e.g.*, Costa-Silva *et al.*, 2015; Roxo *et al.*, 2015). A decisão de muitos autores, que foi a mesma tomada no presente estudo, é deixar estas linhagens evolutivamente distintas (ou seja, os “candidatos a espécie”, Fouquet *et al.*, 2007) sob o mesmo nome até que dados adicionais permitam descrições adequadas (*e.g.*, Oliver *et al.*, 2009; Rato *et al.*, 2015). Esta decisão, que pode parecer um tanto conservadora, teve como objetivo evitar a criação de nomes de espécies que não são distinguíveis morfológicamente e também confusões taxonômicas futuras. Baseados nos resultados de *DNA barcoding* de espécies de raias de água doce do gênero *Potamotrygon* Garman, Toffoni *et al.* (2008) concluíram que, por mais que sistemas de identificação de amostras com base em sequências de DNA, em conjunto com caracteres morfológicos/ecológicos, tenham papel importante nos estudos taxonômicos, a delimitação de espécies novas com base em valores de divergência genética é “excessivamente simplista e até enganador”. Como nenhum dos caracteres morfológicos utilizados no presente estudo foram considerados diagnósticos para separar os diferentes haplogrupos, caso eles fossem considerados espécies distintas, a identificação destas teria de ser baseada em dados moleculares ou em dados de distribuição geográfica, o que não pareceu uma decisão acertada.

Por outro lado, ainda que os dados morfológicos não corroborem os resultados da análise de GMYC e de *DNA barcoding* e nenhuma alteração seja feita na taxonomia de *M. microlepis*, é importante levar em consideração as Unidades Evolutivas Independentes indicadas. Estas unidades podem ser analisadas como Unidades Evolutivas Significativas (UES), que representam espécies ou segmentos populacionais de espécies, cuja conservação maximiza o potencial do sucesso evolutivo futuro destas unidades (Avice, 2000; Hey *et al.*, 2003). As UES, que coincidem ou não com os limites inter-específicos reconhecidos, possuem características tão peculiares, que mereceriam ser consideradas como unidades independentes para fins de conservação (Ryder, 1986; Eizirik, 1996; Aleixo, 2009). Para muitos autores (*e.g.*, Crandall *et al.*, 2000; Hey *et al.*, 2003; Mace, 2004; Aleixo, 2009), as UES deveriam ser os verdadeiros alvos de ações conservacionistas, independentemente do conceito de espécie utilizado. A ideia de criar um conceito associado ao conceito de espécie, mas independente da discussão acadêmica sobre o tema, veio da necessidade de discutir conservação de forma objetiva e pragmática especialmente com e entre as agências governamentais de proteção ambiental (Aleixo, 2009).

Recentemente, a lista brasileira de espécies de peixes de água doce ameaçados de extinção foi atualizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão do governo responsável, entre outras coisas, pela avaliação do estado de conservação das espécies da fauna brasileira. Para elaboração desta lista, publicada em 2014 (<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>), foram analisadas mais de 3.100 espécies de peixes de água doce, incluindo seis das sete espécies nominais de *Mimagoniates*. Destas, *M. lateralis* e *M. sylvicola* foram enquadrados em categorias de ameaça, *M. rheocharis* foi considerada como quase ameaçada, para *M. pulcher*, não há dados suficientes para avaliação e as espécies *M. inequalis* e *M. microlepis* foram consideradas como menos preocupante (LC, do inglês, *least concern*) em termos de conservação. De acordo com os critérios propostos pela IUCN (2001) e adotados pelo ICMBio, um táxon é considerado como LC quando, a partir de um conjunto de dados (*e.g.*, distribuição, abundância, biologia, taxonomia, ecologia) considerados suficientes, é possível avaliar seu *status* de conservação e ele não se enquadra em nenhuma categoria de ameaça. Táxons de distribuição ampla e abundantes são incluídos nesta categoria, assim com táxons raros e distribuição restrita para os quais não há ameaças significativas. Na ocasião da atualização da lista de espécies ameaçadas de extinção, *M. microlepis* foi considerada LC por representar uma espécie amplamente distribuída, frequente e abundante, para a qual não foram detectadas ameaças significativas que a coloquem em risco. Ainda durante a atualização desta lista, foi

colocado que “no Espírito Santo e sul da Bahia, a espécie sofreu redução (não quantificada) em sua área de ocorrência em função de pressões antrópicas (agricultura e urbanização no litoral). Entretanto, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná a espécie ainda é abundante em riachos de áreas preservadas”. Com os resultados obtidos no presente estudo, entretanto, fica claro que talvez seja o caso de reavaliar esta decisão, visto que, dada as diferenças genéticas ao longo da distribuição de *M. microlepis*, para uma conservação eficaz da espécie, esta deve ser feita em escala regional, buscando, ao final, a manutenção de toda a variabilidade genética conhecida. Isto significa, por exemplo, que o fato da espécie ocorrer em áreas preservadas em São Paulo e no Rio de Janeiro (HAP2) não garante a manutenção da diversidade genética de *M. microlepis* nas bacias que drenam os estados da Bahia e Espírito Santo (HAP1), de maneira que, se ocorrer uma extinção local nestas drenagens, esta linhagem será completamente perdida. No momento, não é possível, do ponto de vista morfológico, considerar estes haplogrupos como táxons distintos para que sejam feitas avaliações individuais pelo ICMBio, mas também não seria correto ignorar e negligenciar as informações baseadas na análises moleculares, de maneira que, casos como o de *M. microlepis*, merecem uma atenção diferenciada. Em estudo com duas espécies de anfíbios da Mata Atlântica, Tonini *et al.* (2013) encontraram uma situação semelhante e salientaram que espécies amplamente distribuídas neste domínio, que são categorizada como LC do ponto de vista da conservação podem abrigar uma diversidade críptica, que merece uma atenção diferenciada neste sentido.

Um caso interessante, que corrobora a importância da associação de dados morfológicos e moleculares para analisar de forma mais abrangente a taxonomia e conservação de um táxon, foi aquele apresentado por Costa *et al.* (2012). Estes autores estudaram o complexo de espécies *Hypsolebias flavicaudatus* (Costa & Brasil), um clado de peixes anuais da família Rivulidae, muito parecidos morfológicamente, endêmicos da bacia do rio São Francisco, no domínio Caatinga. Inicialmente, Costa (2002) considerou este complexo de espécies como uma entidade só, amplamente distribuída na bacia do São Francisco e “sem preocupação” em relação à conservação. Entretanto, dez anos depois, após combinar dados morfológicos (*e.g.*, padrão de colorido, dados merísticos e morfométricos) e moleculares (mtDNA), e levando em consideração os critérios estabelecidos pela IUCN, Costa *et al.* (2012) verificaram que este complexo se trata, na verdade, de nove espécies distintas, sendo que quatro delas foram enquadradas em alguma categoria de ameaça: duas estão “criticamente em perigo” (CN), uma “em perigo” (EN) e outra “vulnerável” (VU). Recentemente, Lima *et al.* (2016), baseados em dados moleculares e análises filogeográficas, também propuseram modificações do *status* de conservação de *Trichogenes longipinnis* Britski & Ortega, peixe de água doce da família

Trichomycteridae endêmica da Mata Atlântica. Segundo estes autores, a espécie foi enquadrada em categoria de ameaça em 2004, retirada da lista de espécies ameaçadas de extinção em 2014, mas deve, novamente, entrar nesta lista, tendo com base o grande particionamento da diversidade genética e a aparente susceptibilidade a fatores ambientais estocásticos, que permitem que *T. longipinnis* seja enquadrada na categoria de ameaça vulnerável.

### 5.3. Estrutura filogeográfica e demografia histórica de *Mimagoniates microlepis*

Os resultados da rede de haplótipos e da AMOVA, baseados no gene mitocondrial COI, corroboraram as evidências de forte estruturação genética e fragmentação alopátrica em *M. microlepis*, com a distinção clara de quatro haplogrupos, geograficamente distintos e que não compartilham haplótipos entre si. Aqui, é importante ressaltar que, apesar dos resultados não terem sido apresentados, também foram construídas redes de haplótipos com base no 16S e nos genes mitocondriais concatenados (16S e COI) e ambas foram congruentes com esta estruturação. Apesar do reduzido número de amostras, o mesmo foi feito com relação ao gene RAG2 e os resultados foram equivalentes aos da hipótese filogenética nuclear, o que significa ausência de estruturação clara, exceto para o HAP4. Como mencionado anteriormente, este é um resultado esperado no estudo de marcadores nucleares, visto que o tempo requerido para que as populações isoladas atinjam o monofiletismo recíproco é maior (em média  $4N_e$  gerações) (Neigel & Avise, 1986). Assim, nestes casos, é comum as populações não serem monofiléticas devido ao compartilhamento de polimorfismos ancestrais e, por isto, os métodos filogenéticos e filogeográficos não são capazes de detectar padrões nem estruturação genética (Cunha & Solé-Cava, 2012), como pode ter acontecido no presente estudo. Já em relação ao mtDNA, tanto a hipótese filogenética quanto a rede de haplótipos indicaram que o tempo de isolamento foi suficientemente longo para que os haplogrupos tenham se tornado monofiléticos entre si. Isto significa que, muito provavelmente, houve uma subdivisão populacional no passado e, após contínuos eventos de extinção das linhagens ancestrais, os indivíduos das “populações filhas” (i.e., os haplogrupos propostos) passaram a compartilhar entre si um ancestral mais recente do que o ancestral que compartilham/compartilhavam com o das outras populações (Tajima, 1983).

De acordo com o grau de separação genética e geográfica das linhagens, Avise *et al.* (1987) definiram cinco padrões ou categorias filogeográficas, que integram um contínuo desde uma separação mais antiga, em que o monofiletismo recíproco claramente demonstra fragmentação alopátrica, até um sinal fraco de estruturação causado pela separação recente ou

existência de fluxo gênico atual entre as populações. Os resultados do presente estudo indicam que *M. microlepis* (levando em consideração o mtDNA) enquadra-se na categoria filogeográfica do tipo I, que significa a existência de alta divergência genética e linhagens alopátricas (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000). Esta categoria é caracterizada por clados geograficamente circunscritos, separados por grande número de mutações e o cenário histórico responsável por este padrão seria, provavelmente, a presença de uma conspícua barreira ao fluxo gênico separando as populações por longos períodos (Avise, 2000; Martins & Domingues, 2011). Este resultado está de acordo com o esperado em espécies de peixes de água doce ocorrentes em bacias costeiras isoladas (como é o caso de *M. microlepis*), para as quais as porções de terra e o oceano funcionam como barreiras geográficas, limitando estas espécies às bacias em que ocorrem após sua formação. De acordo com Avise (2000), de fato, em virtude da desconexão atual entre as bacias hidrográficas, é comum que populações de espécies de peixes de corpos d'águas distintos e independentes sejam geneticamente estruturadas.

Do ponto de vista geográfico, a forte estruturação supracitada que ocorre em *M. microlepis* (baseada no gene COI) indicou a existência de uma descontinuidade filogeográfica latitudinal dos rios e riachos da Mata Atlântica, evidenciada em três “quebras filogeográficas” pelos limites de distribuição dos haplogrupos (Fig. 23). A quantidade restrita de informações disponíveis na literatura dificulta, no entanto, afirmar se os resultados aqui obtidos representam uma idiosincrasia de *M. microlepis* ou se é possível estabelecer um padrão filogeográfico mais generalizado para as bacias hidrográficas da MA e sua biota. Apesar do considerável aumento dos estudos de filogeografia de peixes de água doce neotropicais nos últimos anos (*e.g.*, Hubert *et al.*, 2007; Piggot *et al.*, 2011; Borba *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013), no que diz respeito à ictiofauna da MA o cenário não tem mudado muito e pouquíssimos trabalhos foram publicados. Turchetto-Zolet *et al.* (2013), por exemplo, fizeram uma revisão dos estudos de filogeografia realizados com táxons ocorrentes na América do Sul até aquele momento e todos que incluíram peixes de água doce (citados pelos autores) envolveram apenas a fauna amazônica. Com relação aos táxons endêmicos de rios (ou de trechos deles) que drenam a MA, como o caso de *M. microlepis*, o número de trabalhos desenvolvidos é ainda menor e a maioria destes estudos foi feita com grupos de distribuição mais restrita, especialmente às drenagens da região Sudeste e, principalmente, Sul do Brasil (*e.g.*, Hirschmann *et al.*, 2015; Thomaz *et al.*, 2015a). Uma exceção, foi o trabalho de Pereira *et al.* (2012), que fizeram uma análise filogeográfica de *Hoplias malabaricus*, espécie com numerosos problemas taxonômicos e amplamente distribuída em toda a Região Neotropical (Oyakawa & Mattox, 2009). Neste trabalho, os autores incluíram amostras da bacia do rio São Francisco e de

algumas bacias costeiras do leste do Brasil que drenam a MA, entre os estados da Bahia e Paraná. Assim, os resultados do presente estudo serão também comparados com aqueles disponíveis para fauna terrestre. Apesar desta comparação talvez não contribuir diretamente para um melhor entendimento da história das drenagens envolvidas (uma vez que para estes táxons, muitas vezes os rios representam barreiras de distribuição e não local de ocorrência), ela é interessante para fornecer uma visão mais generalizada, que pode contribuir futuramente para um entendimento mais completo da história da MA, uma paisagem que inclui floresta e bacias hidrográficas.

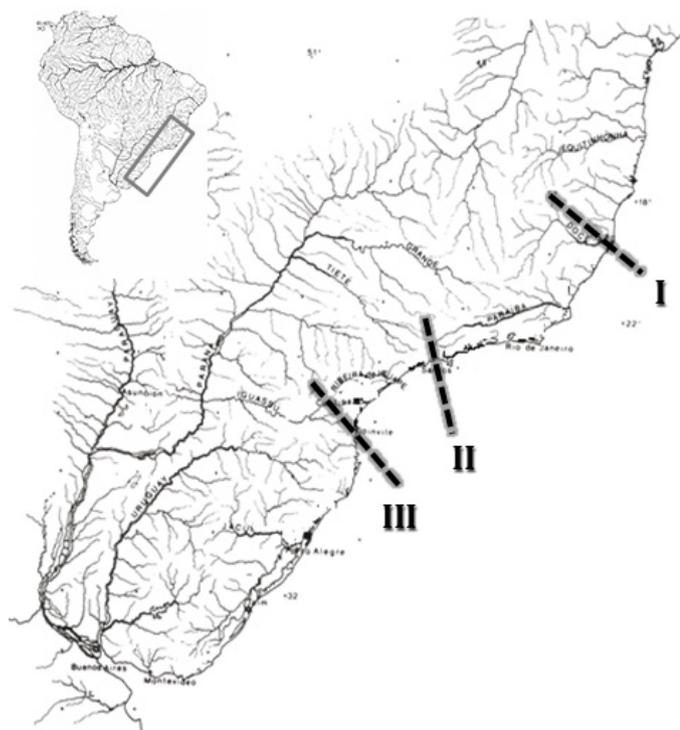
A primeira descontinuidade observada no presente estudo ("I", Fig. 23), representada pelo limite sul do HAP1, à altura de um pequeno riacho na cidade de São Mateus (ES), separa os haplótipos ocorrentes mais ao norte, em bacias que drenam a BA e o norte do ES, dos demais. Esta quebra, que se deu ao norte da bacia do rio Doce, também foi encontrada em *H. malabaricus* (Pereira *et al.*, 2012: Fig. 1, página 4), com a separação das populações desta espécie que ocorrem entre os rios Paraguaçu (drenagem costeira da BA) e o rio Doce (ES) das que ocorrem em bacias costeiras do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. De acordo com alguns autores (*e.g.*, Pellegrino *et al.*, 2005; Brunes *et al.*, 2015), com relação a biota terrestre, quebras filogeográficas ao longo da MA podem ser coincidentes com a ocorrência de grandes rios, tais como o Doce. Descontinuidades filogeográficas congruentes com a existência desta bacia são recorrentes em diversas espécies de aves, anfíbios, répteis (*e.g.*, Pellegrino *et al.*, 2005; Cabanne *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Thomé *et al.*, 2010; d'Horta *et al.*, 2011; Maldonado-Coelho, 2012) e até plantas (*e.g.*, Ribeiro *et al.*, 2011), com a formação de haplogrupos de distribuição alopatrica ao norte e sul do seu curso. Aqui, é importante ressaltar, que apesar desta ser uma quebra recorrente em diversos táxons, para outros, o rio Doce não representa uma barreira efetiva para as diferentes populações (*e.g.*, Colombi *et al.*, 2010; Thomé *et al.*, 2014). Estes resultados indicam que, apesar de ser possível estabelecer um padrão um pouco mais geral, a história filogeográfica da MA e da sua biota é extremamente complexa e a interpretação desta história pode variar dependendo do táxon utilizado. Como pode ser observado na Fig. 2, há um *gap* na distribuição de *M. microlepis* entre rios do Espírito Santo, ao sul de São Mateus, e o Rio de Janeiro, ao norte da bacia do Paraíba do Sul. Este *gap* pode ser associado à falha de amostragem do presente estudo, visto que há registros da espécie em algumas bacias que drenam este trecho (*e.g.*, Menezes & Weitzman, 2009; Sarmiento-Soares & Martins-Pinheiro, 2010, 2014). Espécimes desta região foram, inclusive, analisados na parte morfológica do presente estudo (*e.g.*, MZUSP 26893, 26894, 26898). Assim, apesar dos resultados obtidos no presente estudo concordarem com a quebra filogeográfica na altura do rio Doce, para uma

resposta conclusiva, seria necessário incluir amostras das bacias localizadas ao sul desta drenagem na análise. Pereira *et al.* (2012) incluíram amostras de *H. malabaricus* da bacia do rio Itabapoana (drenagem costeira ao sul do rio Doce, que drena os estados do RJ e ES) e verificaram que os haplótipos ocorrentes nesta bacia são mais relacionados aos de drenagens mais ao sul, ratificando a existência da quebra mencionada, com separação entre haplogrupos ao norte e sul do Doce.

A segunda grande quebra observada ao longo da distribuição de *M. microlepis* está localizada em São Paulo (“II”, Fig. 23), à altura da cidade de Peruíbe, litoral sul do estado, e é responsável pela separação dos haplótipos distribuídos em riachos costeiros desde a bacia do rio Paraíba do Sul (RJ) até Peruíbe (SP) dos demais. Esta quebra também indica separação destes do haplótipo ocorrente na bacia do Alto Tietê, sendo, portanto, uma ruptura filogeográfica interessante tanto no sentido norte-sul, quanto no sentido oeste-leste. A segunda quebra observada em *M. microlepis* não foi congruente com aquela encontrada em *H. malabaricus*. Segundo Pereira *et al.* (2012), a quebra filogeográfica nesta espécie se deu mais ao norte, no RJ, à altura do “alinhamento magmático de Cabo Frio” (Riccomini *et al.*, 2005), que teria tido efeito vicariante significativo para esta espécie, com o isolamento de bacias costeiras leste e sudeste durante períodos glaciais. Os resultados obtidos em relação a *M. microlepis* também foram incongruentes com os encontrados em *Hollandichthys multifasciatus* (Eigenmann & Norris), espécie da família Characidae, distribuída em pequenos riachos desde o Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (Thomaz *et al.*, 2015a). De acordo com estes autores, existem duas quebras nesta região, uma à altura de Bertioga (SP) e outra à altura de Guaraqueçaba (PR), ou seja, mais ao norte e mais ao sul, respectivamente, da encontrada em relação a *M. microlepis*. Aparentemente, a história filogeográfica deste trecho e de sua biota é bem complexa. Em relação à fauna terrestre, por exemplo, Cabanne *et al.* (2013) apontaram para a existência de duas barreiras filogeográficas principais na região centro-sul de São Paulo, tendo como base a congruência entre resultados de estudos com anfíbios, aves e mamíferos (i.e., “barreiras II e III”, para maiores detalhes, ver Fig. 1, página 373, em Cabanne *et al.*, 2013). Apesar de não serem perfeitamente coincidentes, estas barreiras também estão localizadas ao sul de Ilha Bela (SP) e ao norte do Paraná, assim como encontrado em *M. microlepis*. Este é um resultado interessante, que indica que, neste trecho, a descontinuidade encontrada nesta espécie é mais congruente com aquela da biota terrestre do que a de outras espécies de peixes.

A terceira e última quebra filogeográfica identificada no presente estudo (“III”, Fig.23) está localizada ao sul da Baía de Paranaguá (PR) e separa os haplótipos do HAP3 daqueles ocorrentes ainda mais ao sul, o HAP4. O limite sul de distribuição das populações de *H.*

*malabaricus* analisadas por Pereira *et al.* (2012) é exatamente à altura desta quebra (rio Perequê, na cidade de Paranaguá, PR). Como esta espécie é amplamente distribuída e ocorre ao sul deste ponto (*e.g.*, Malabarba *et al.*, 2013), só será possível afirmar se esta é uma descontinuidade recorrente entre *M. microlepis* e *H. malabaricus* após a análise de material adicional desta última espécie. Já em relação a *Hollandichthys multifasciatus*, houve congruência entre os resultados obtidos, com quebra observada em um riacho afluente da baía de Paranaguá, à altura do município de Quatro Barras, no PR (Thomaz *et al.*, 2015a, detalhes no material suplementar - “Apêndice S1”). Em relação à ocorrência desta espécie em riachos que deságuam no estuário de Paranaguá, os autores salientam que, apesar da proximidade geográfica e atribuição à mesma paleodrenagem proposta por eles (ver discussão adiante), as populações de *H. multifasciatus* de Guaraqueçaba (ao norte da Baía) estão mais relacionadas filogeneticamente às da Ribeira de Iguape (SP) do que às de Paranaguá (ao sul da Baía). Resultados semelhantes foram encontrados em *Mimagoniates microlepis*, uma vez que os haplótipos de Guaraqueçaba fazem parte, junto com os do Ribeira de Iguape e Alto Tietê, do HAP3, enquanto que aqueles ocorrentes em Paranaguá estão incluídos no HAP4, junto com os haplótipos das bacias que drenam Santa Catarina e o Rio Grande do Sul (como acontece em *H. multifasciatus*). Para a fauna terrestre, esta quebra também foi identificada em espécies de insetos, répteis e planárias terrestres (Grazziotin *et al.*, 2006; Batalha-Filho *et al.*, 2010; Álvarez-Presas *et al.*, 2014). Ainda para a biota terrestre, foram registradas quebras um pouco mais ao norte e um pouco mais ao sul desta encontrada para *M. microlepis* (*e.g.*, Thomé *et al.*, 2010 e Brunet *et al.*, 2015, respectivamente).



**Figura 23.** Descontinuidades filogeográficas propostas no presente estudo, com base na distribuição dos haplogrupos de *Mimagoniates microlepis*. Mapa modificado de Weitzman *et al.* (1988).

Os diferentes haplogrupos de *M. microlepis* estão distribuídos, principalmente, ao longo de um conjunto maior de bacias, conhecido como bacia do Leste ou drenagens costeiras da porção oriental do Brasil, que drena a faixa litorânea brasileira e se estende, aproximadamente, da Bahia ao Estado do Rio Grande do Sul (Menezes, 1972; Ribeiro, 2006). Apesar de esta ser uma área reconhecidamente diferenciada em termos de sua ictiofauna das demais unidades faunísticas neotropicais em virtude das elevadas taxas de endemismo (Bizerril, 1994; Ribeiro, 2006; Buckup, 2011), não compreende uma área biogeográfica uniforme (Camelier & Zanata, 2014). Assim, diversos autores propuseram ou discutiram sobre quebras latitudinais em menor ou maior escala nestas drenagens, tendo como base, principalmente, o compartilhamento da ictiofauna de água doce (e.g., Menezes, 1982; Bizerril, 1994; Ribeiro, 2006; Carvalho, 2007; Buckup, 2011; Camelier & Zanata, 2014) e as quebras observadas ao longo da distribuição de *M. microlepis* corroboram esta hipótese. Além disso, como será detalhado adiante, algumas quebras filogeográficas encontradas correspondem àquelas associadas a padrões de distribuição de espécies de peixes de água doce na região, sugerindo associação entre os processos responsáveis pela estruturação da variação genética de *M. microlepis* e aqueles que culminaram na estruturação da diversidade da ictiofauna nestas bacias, conforme proposto por Thomaz *et al.* (2015a) para *H. multifasciatus*.

Segundo Avise (2000), uma abordagem útil para inferir a história demográfica de uma população a partir de genealogias inclui a análise de duas medidas distintas da variação de haplótipos, ambas realizadas no presente estudo: (1) a diversidade haplotípica ( $H_d$ ), que condensa informações sobre os números e frequências de alelos diferentes em um *locus*, independente da relação entre as sequências; e (2) a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), que representa a divergência ponderada das sequências entre indivíduos de uma população, independente da quantidade de haplótipos diferentes. A interpretação em conjunto dos valores de  $H_d$  e  $\pi$  pode fornecer informações valiosas a respeito da história das populações (Grant & Bowen, 1998; Avise, 2000). Segundo estes autores, valores elevados de diversidade haplotípica (i.e.,  $H_d > 0,5$ ) combinados com diversidade nucleotídica baixa (i.e.,  $\pi < 0,5\%$ ) são um indicativo de que houve rápido crescimento da população a partir de uma população ancestral de  $N_e$  (tamanho efetivo) pequeno, havendo pouco tempo para acumular diferenças nas sequências, mas com tempo suficiente para apresentar variação haplotípica. Este é o caso do HAP1 de *M. microlepis*, de distribuição mais ao norte, e os valores de  $H_d = 0,7$  (alto) e  $\pi = 0,4\%$  (baixo) indicam expansão territorial recente neste haplogrupo. Por outro lado, os demais haplogrupos apresentaram valores altos com relação às duas estimativas ( $H_d > 0,5$  e  $\pi > 0,5\%$ ) e a combinação destes resultados é esperada, principalmente, em populações estáveis, com longa história

evolutiva (Grant & Bowen, 1998; Avise, 2000). Os valores de  $H_d$  e  $\pi$  serão discutidos mais a fundo posteriormente, para as diferentes localidades dentro de cada haplogrupo. Pensando nos haplogrupos como um todo, o que é interessante observar, é que, baseando-se na ideia de que, quanto mais altos forem os valores de  $\pi$ , mais antiga e estável tende ser a população (Spellman & Klicka, 2006), as drenagens localizadas mais ao sul parecem representar o ponto de partida da origem, diversificação e expansão populacional de *M. microlepis*, com ocupação posterior das drenagens mais ao norte. Não é possível comparar os resultados com os dados disponíveis na literatura para as outras espécies de peixes mencionadas, pois Pereira *et al.* (2012) não utilizaram esta abordagem em *Hoplias malabaricus* e Thomaz *et al.* (2015a) não detectaram evidências de uma clina latitudinal na diversidade genética entre as diferentes populações de *Hollandichthys multifasciatus*. Os resultados encontrados no presente estudo, no entanto, foram comparados com aqueles obtidos por Menezes *et al.* (2008), que estudaram a biogeografia de Glandulocaudini (Glandulocaudinae na época) e esta comparação indicou um ponto concordante e outro não. A concordância está em relação à origem e diversificação proposta da tribo como um todo, já que a hipótese de Menezes *et al.* (2008) é que o grupo teria se originado na bacia do alto rio Paraná, no escudo cristalino brasileiro (ao sul), com posterior ocupação das bacias costeiras adjacentes (no estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo) e, então, expansão no sentido norte. Em relação a *M. microlepis*, no entanto, os resultados discordam, visto que Menezes *et al.* (2008) propõem que, em termos de colonização, a expansão da espécie na área estudada por eles (que inclui rio Iguaçu e drenagens costeiras de São Paulo, Paraná e Santa Catarina) parece ter sido no sentido norte-sul, leste-oeste. A discrepância entre estes resultados será discutida com mais detalhes no item 5.4, a seguir.

Ao comparar os resultados de estruturação e quebras filogeográficas, além daqueles de diversidade genética, obtidos com relação a *M. microlepis* com aqueles disponíveis para a fauna terrestre da MA, considerações interessantes se fazem pertinentes. Segundo alguns autores (*e.g.*, Carnaval & Moritz, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Amaral *et al.*, 2013), organismos amplamente distribuídos na MA tendem a apresentar maior diversidade genética, maior estrutura populacional e história demográfica cada vez mais estável em locais ao norte do rio Doce, ao passo que populações ao sul tendem a apresentar menor diversidade, menor estruturação, além de traços de eventos de recolonização recente a partir das populações mais ao norte. A explicação para este cenário está embasada no modelo de “estabilidade-extinção” (Amaral *et al.*, 2013), que, baseado na clássica hipótese de refúgios pleistocênicos (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1981), sugere que padrões atuais de variação genética intraespecífica são resultados de períodos de isolamento em áreas estáveis da floresta (*i.e.*, refúgios) e extinção em

áreas fora do refúgios (instáveis) durante os períodos glaciais, em especial no Último Máximo Glacial (UMG), por volta de 21 mil anos atrás (Carnaval & Moritz, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Amaral *et al.*, 2013). Segundo Carnaval & Moritz (2008) e Carnaval *et al.* (2009), um dos principais refúgios na MA está em sua porção central, entre os rios São Francisco e Doce (i.e., “Refúgio Bahia”), de maneira que ao norte deste último rio estariam as áreas estáveis e ao sul áreas instáveis. Assim, para a fauna terrestre da MA, a estabilidade do hábitat (associada à existência dos refúgios) parece ser o principal fator estruturante na diversidade genética (Carnaval *et al.*, 2009), o que justificaria o padrão (supracitado) encontrado acima do rio Doce. Os resultados do presente estudo, no entanto, discordam desta hipótese, uma vez que maior diversidade genética e estruturação filogeográfica foram encontradas nos haplogrupos ocorrentes ao sul do rio Doce, em áreas consideradas instáveis.

Recentemente, Thomaz *et al.* (2015a) propuseram a existência de 12 paleodrenagens entre Parati (RJ) e a bacia do rio Maquine (RS) durante o UMG, tendo como base informações topográficas e batimétricas (ver seção ‘Material & Métodos’ destes autores para maiores detalhes: páginas 3 e 4), associadas a informações do mtDNA de *Hollandichthys multifasciatus*, e testaram o efeito destas *versus* a estabilidade do habitat sobre a divergência genética desta espécie. Assim, a partir de uma abordagem explícita de teste de hipóteses, Thomaz *et al.* (2015a) verificaram que a existência de refúgios florestais estáveis não deixou marcas significativas sobre o padrão de estruturação desta espécie que, assim como em *M. microlepis*, é dependente de áreas florestadas. Os autores corroboraram, então, o papel das paleodrenagens na variação da estruturação genética ao longo de toda a distribuição de *Hollandichthys* na MA e propuseram a existência de paleoconexões durante períodos de retração do nível do mar no Pleistoceno como o principal fator na estruturação da divergência recente de peixes de água doce de drenagens costeiras brasileiras. Como já mencionado e como será visto em detalhes adiante, os resultados encontrados em relação a *M. microlepis* no presente estudo certamente auxiliam a corroborar tal hipótese. Aparentemente, no entanto, a história evolutiva de *M. microlepis* é mais antiga do que aquela proposta para *H. multifasciatus*, cujas divergências tiveram início no Pleistoceno (Thomaz *et al.*, 2015a). De acordo com as datações obtidas a partir da análise de relógio molecular baseada no gene COI (dados não apresentados), divergências entre os quatro grandes haplogrupos de *M. microlepis* tiveram início no Neógeno (parte do antigo Terciário) [média=3,6 m.a.; 95%\_HPD=6,6-1,8 m.a.]. Apesar de esta datação ser um pouco controversa em virtude da relação (HAP4, *M. lateralis*) para o mtDNA, os resultados apresentados no Capítulo 1, baseados em três genes analisados (16S, COI e RAG2), também apontam para o Neógeno como período de início da divergência na espécie [média=4,0 m.a.;

95%\_HPD=6,3-2,2 m.a.] (Capítulo 1: Fig. 8). As divergências entre os HAP1, HAP2 e HAP3 tiveram início entre o Plioceno-Pleistoceno nas duas análises [média=2,3 m.a.; 95%\_HPD=5,0-1,4 m.a. para o COI; média=2,7 m.a.; 95%\_HPD=4,4-1,5 m.a. para os genes concatenados]. As divergências entre as diferentes populações dentro de cada haplogrupo são bem mais recentes e datam, em todas as análises, do Pleistoceno, sempre mais recente que 1,7 m.a.. Assim, hipóteses adicionais à da existência de paleodrenagens são necessárias para tentar explicar o padrão e estrutura filogeográfica encontrada em *M. microlepis*, conforme já previsto por Thomaz *et al.* (2015a), em grupos de divergência mais antiga. A seguir, serão discutidos resultados específicos para cada haplogrupo e essas hipóteses serão mencionadas, mas, de uma maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a história de *M. microlepis* é bem complexa e foi influenciada tanto por eventos mais antigos, datados do Terciário, quanto eventos mais recentes, datados do Quaternário e associados diretamente ao UMG. Esta complexidade já havia sido prevista por Menezes *et al.* (2008). Os eventos antigos teriam sido responsáveis pela separação e posterior estruturação dos grandes agrupamentos haplotípicos de *M. microlepis* e os eventos mais recentes estariam associados a casos específicos, sendo responsáveis pela distribuição das diferentes populações dentro de cada haplogrupo.

### **5.3.1. Haplogrupo 1: considerações sobre distribuição, estrutura filogeográfica e história demográfica**

O HAP1 de *Mimagoniates microlepis* tem como limite norte de distribuição a bacia do rio Pardo, uma das principais drenagens costeiras do leste do Brasil (Buckup, 2011), que tem suas nascentes em regiões de planalto do escudo cristalino brasileiro, no Estado de Minas Gerais. Assim, é válido ressaltar que *M. microlepis*, espécie tipicamente costeira, foi coletada apenas próximo à foz do rio Pardo, na cidade de Canavieiras (BA), já em região de planície litorânea, de maneira que a ocorrência da espécie em bacias que drenam áreas de planalto continua restrita àquelas mais ao sul (*e.g.*, Alto Tietê, Tibagi, Iguaçu). Ainda em relação à ocorrência de *M. microlepis* na bacia rio Pardo, é interessante mencionar que, com o material coletado no presente estudo (2012), esta drenagem passou a ser o limite norte de distribuição de *M. microlepis* (Camelier & Zanata, 2014), antes apenas conhecida das bacias do extremo sul da Bahia, quase na divisa com o Espírito Santo (Menezes *et al.*, 2007; Menezes & Weitzman, 2009). Sobre a ocorrência de *M. microlepis* em bacias costeiras da BA e ES de uma forma geral, vale ressaltar que, apesar dos inúmeros esforços de coleta e da análise de material destas drenagens tanto no presente quanto no passado recente (*e.g.*, Sarmiento-Soares & Martins-Pinheiro, 2010,

2014; Camelier & Zanata, 2014), é possível afirmar que não se trata de uma espécie comum ou abundante nestes locais. Esta informação, associada à reconhecida degradação ambiental ocorrente nestes estados (tanto da floresta, como das bacias hidrográficas), sugere que extinções locais de *M. microlepis* podem ter ocorrido recentemente, em especial nos pequenos riachos, corpos d'água mais vulneráveis às alterações ambientais (Buckup, 1996). Entre Vitória (ES) e a foz do rio Doce, por exemplo, a espécie aparece em pequenas drenagens e já foi bem comum no passado. Atualmente, no entanto, com as modificações das diversas bacias que deságuam direto no mar, a espécie tem se tornado cada vez mais rara (F. Vieira, comunicação pessoal). De fato, segundo Menezes & Weitzman (2009), é possível que todas as espécies de Glandulocaudini (= Glandulocaudinae na época) estejam sujeitas a extinções locais causadas por poluição doméstica, industrial, agrícola.

As análises filogenéticas e de GMYC, baseadas em mtDNA, não indicaram nenhuma estruturação clara ao longo da distribuição deste haplogrupo, que só foi recuperada através da análise de AMOVA. Ao analisar amostras de *Hoplias malabaricus* de distribuição semelhante, Pereira *et al.* (2012) verificaram a formação de dois haplogrupos, indicando maior estruturação da espécie nesta área. Outra diferença interessante entre os resultados obtidos nos dois tipos de estudo é que, segundo Pereira *et al.* (2012), os haplótipos ocorrentes nesta região (i.e., acima do rio Doce, onde está distribuído o HAP1) não formam um grupo monofilético. Os indivíduos coletados em São Mateus (ES), por exemplo, fazem parte de um agrupamento mais relacionado aquele formado por haplótipos do rio Paraíba do Sul e de outras pequenas drenagens do litoral do Rio de Janeiro (equivalente ao HAP2 de *M. microlepis*).

A rede do HAP1 indicou que a maioria dos haplótipos pertencentes a este haplogrupo é exclusiva da bacia onde ocorre e na maioria das bacias analisadas foi detectado apenas um haplótipo. As exceções são a bacia do rio Peruípe, onde foram detectados haplótipos distintos e as bacias dos rios Pardo (BA) e Itaúnas (ES), onde foi encontrado um haplótipo único e compartilhado. Este compartilhamento chama atenção, visto que estas são bacias completamente isoladas hoje e relativamente distantes entre si. Por exemplo, não houve compartilhamento de haplótipos entre a bacia do rio Itaúnas e São Mateus, que apesar de isoladas estão bem próximas. Pereira *et al.* (2012) associam o compartilhamento de haplótipos de *H. malabaricus* entre bacias do extremo sul da Bahia e norte do Espírito Santo às possíveis conexões pretéritas entre as porções baixas destas bacias no Pleistoceno, através de lagoas formadas sobre o banco de Abrolhos, hoje submerso e fazendo parte da plataforma continental brasileira (maiores detalhes em Pereira *et al.*, 2012: página 6). A conexão entre a plataforma continental brasileira e a Mata Atlântica tem sido foco de estudos atuais (e.g., Leite *et al.*, 2016)

e os resultados obtidos até então corroboram a ideia de que, durante o UMG, a Mata Atlântica teria se expandido em direção à plataforma continental. A possível expansão da floresta nesta época é sugerida por Leite *et al.* (2016: Fig.3a, página 4) e, pela análise do mapa, é possível perceber a ocupação da plataforma continental pela MA à altura da bacia do rio Pardo durante o UMG. Assim, o compartilhamento de haplótipos entre os rios Pardo e Itaúnas pode estar associado à hipótese de paleodrenagens e de conexões pretéritas das porções baixas dos rios da MA durante o Pleistoceno, como já indicado por alguns autores em outras drenagens do leste do Brasil (*e.g.*, Pereira *et al.*, 2012; Thomaz *et al.*, 2015a). Aqui, é interessante destacar que entre as bacias dos rios Pardo e Itaúnas, há uma série de drenagens e *M. microlepis* tem ocorrência conhecida na maioria delas (*e.g.*, rios Mucuri, Peruípe, Jucuruçu).

Apesar do teste de mudança do tamanho populacional ( $R_2$ ) ter indicado expansão demográfica significativa do HAP1, a mesma não foi corroborada através da análise de *Bayesian Skyline Plot*, que indicou estabilidade do tamanho efetivo desta população ao longo dos últimos 35 mil anos. Este resultado, no entanto, deve ser interpretado com cautela, visto que apenas o gene COI foi utilizado nesta última análise. Segundo Batalha-Filho (comunicação pessoal), em análises com espécies de aves ocorrentes na Mata Atlântica, este tipo de análise só recuperou mudanças no tamanho efetivo da população quando realizada com mais de um marcador. Assim, a inclusão de mais marcadores na análise BSP se faz necessária para corroborar ou refutar a hipótese encontrada no presente estudo.

### **5.3.2. Haplogrupo 2: considerações sobre distribuição, estrutura filogeográfica e história demográfica**

O HAP2 é representado pelo maior número de amostras, oriundas de mais pontos distintos de coleta, que incluem drenagens costeiras dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. No RJ, foram amostradas as bacias do rio Paraíba do Sul e Macacu, sendo a primeira o limite norte de distribuição do HAP2 e a segunda, localidade tipo de *Mimagoniates microlepis*. Em SP, foi amostrada uma série de pequenas drenagens costeiras independentes, localizadas entre Ubatuba e Peruípe. Segundo a rede de haplótipos e análise de GMYC, há, dentro do HAP2, dois agrupamentos distintos: (1) HAP2\_norte, que inclui as bacias dos rios Paraíba do Sul e Macacu, RJ, e bacias costeiras de Ubatuba e Caraguatatuba, SP e o (2) HAP2\_sul, que inclui bacias costeiras entre São Sebastião e Peruípe, SP. As análises filogenéticas baseadas no mtDNA, no entanto, só recuperaram o HAP2\_sul como monofilético e a AMOVA indicou maior variância dentro das populações quando estes filogrupos foram considerados como populações na

análise. No trabalho com as traíras, Pereira *et al.* (2012) incluíram amostras das bacias dos rios Paraíba do Sul e Macacu e encontraram resultados incongruentes em relação aos obtidos no presente estudo. Segundo estes autores, indivíduos do Paraíba do Sul estão relacionados aqueles coletados em bacias mais ao norte (*e.g.*, rios Doce e São Mateus; aqui, equivalentes ao HAP1), enquanto os do rio Macacu têm relação mais estreita com aqueles coletados em bacias mais ao sul, incluindo o Ribeira de Iguape (SP) e o rio Perequê (afluente da Baía de Paranaguá, PR) (ambos incluídos no HAP3 no presente estudo). Alguns dos resultados de relação de parentesco, obtidos no presente estudo em relação a *M. microlepis*, também foram incongruentes em relação aqueles apresentados por Thomaz *et al.* (2015a) relativos a *Hollandichthys multifasciatus* (ver topologia completa no material suplementar – “Apêndice S2”). Em primeiro lugar, segundo estes autores, indivíduos coletados em drenagens entre Parati (RJ) e São Sebastião (SP) formam um clado, que inclui amostras de Ubatuba. No presente estudo, a relação entre indivíduos de São Sebastião e de bacias entre o Rio de Janeiro, Ubatuba e Caraguatatuba não foi recuperada em nenhuma das análises. Os autores também sugerem relação mais estreita entre os espécimes coletados no Alto Tietê e bacias costeiras em Bertioga, Santos e Peruíbe, que formam um clado relacionado ao de espécimes da bacia do Ribeira de Iguape (SP) e Guaraqueçaba (PR). Ao comparar este resultado com aqueles obtidos no presente estudo, duas considerações se fazem pertinentes: (1) espécimes de *M. microlepis* das bacias dos rios Alto Tietê, Ribeira de Iguape e de Guaraqueçaba estão mais relacionados entre si e formam o HAP3 (ver detalhes adiante) e (2) apesar de não terem sido coletadas amostras de *M. microlepis* em Santos exatamente, foram coletadas imediatamente ao norte (Bertioga) e ao sul (São Vicente) e estes indivíduos, em todas as análises, parecem estar mais relacionados aqueles coletados em São Sebastião e não aos espécimes do Alto Tietê, como encontrado por Thomaz *et al.* (2015a) em relação a *H. multifasciatus*.

Como mencionado anteriormente, a principal quebra filogeográfica associada ao HAP2 se deu na região de Peruíbe e separa este haplogrupo do HAP3. As análises feitas dentro do HAP2, no entanto, indicam que os filogrupos HAP2\_norte e HAP2\_sul não compartilham haplótipos, indicando uma quebra filogeográfica latitudinal mais específica. Sobre esta quebra, é interessante notar que esta se deu à altura da Ilha Bela, entre Caraguatatuba e São Sebastião, onde está localizado o Planalto de Juqueriquerê, um conjunto de morros com altitudes entre 600-750 metros, com distintos nivelamentos, que podem ser interpretados como resultado de movimentação tectônica de blocos num padrão de *horst* e *graben* (Campanha, 1994). Segundo este autor, o Planalto do Juqueriquerê, originado, provavelmente, no Mioceno Superior, representa uma notável saliência costeira que funciona como um importante divisor de águas,

separando as bacias hidrográficas que drena em direção à planície de Caraguatatuba daquelas que deságuam mais ao sul. À altura desta quebra, Thomaz *et al.* (2015a) propuseram a existência de duas paleodrenagens (a 3 e a 4, no sentido norte-sul), mas é possível perceber no mapa apresentado por estes autores (Fig. 3, página 7) e também através da plotagem dos pontos utilizados por eles no Google Earth (disponíveis no material suplementar – “Apêndice S1”), que estas, apesar de vizinhas, eram independentes, o que pode indicar que bacias entre Caraguatatuba e São Sebastião não apresentam conexão há bastante tempo. Conti (2009), ao analisar a evolução de paleodrenagens na plataforma continental da região de São Sebastião, corrobora, a partir de dados geomorfológicos, a existência de paleodrenagens independentes nesta área. A ausência de paleoconexões pode, portanto, justificar o não compartilhamento de haplótipos e consequente quebra filogeográfica encontrada nesta região em relação ao HAP2. Apesar de Thomaz *et al.* (2015a) não terem incluído amostras de Caraguatatuba, também é possível verificar no mapa apresentado que as pequenas bacias costeiras e isoladas que hoje drenam Ubatuba e Caraguatatuba fizeram parte da mesma paleodrenagem no UMG, o que pode justificar o compartilhamento de haplótipos de *M. microlepis* entre bacias nesta região. A hipótese da existência de paleodrenagens nesta região também poderia explicar o compartilhamento de haplótipos entre bacias que drenam Bertioiga e São Sebastião, atualmente isoladas, mas que teriam sido conectadas em algum momento no passado recente (UMG). Na bacia do rio Peruíbe, limite sul de distribuição do HAP2, há um haplótipo único e exclusivo de *M. microlepis* e o mesmo resultado foi encontrado em *H. multifasciatus* por Thomaz *et al.* (2015a), que propuseram, nesta região, a existência de uma paleodrenagem (número 7). Aqui, é importante ressaltar que amostras de ambas as espécies foram coletadas no mesmo local, i.e., riacho Cachoeira da Anta, na localidade de Guaraú, Peruíbe (*M. microlepis*, UFRGS 916 e *H. multifasciatus*, UFRGS 11783), de maneira que seria interessante analisar espécimes de diferentes localidades nesta bacia para comparar os resultados. Entre as paleodrenagens de Santos (discutida adiante) e Peruíbe, Thomaz *et al.* (2015a) sugerem a existência de outras (= áreas marcadas em cinza na Fig. 3, página 7), mas como os autores não tinham amostras de *H. multifasciatus* de bacias atuais correspondentes a estas, as mesmas não foram propostas oficialmente como paleodrenagens. No presente estudo, no entanto, foram analisadas amostras de *M. microlepis* desta região, que corresponde hoje a São Vicente, Mongaguá e Itanháem, e os resultados obtidos indicaram compartilhamento de haplótipos entre as bacias aí localizadas, o que ajuda a corroborar a existência de uma possível paleodrenagem correspondente, como proposto por Thomaz *et al.* (2015a). Especialmente no litoral de São Paulo, há fortes indícios geomorfológicos que sustentam a hipótese de Thomaz *et al.* (2015a). Conti & Furtado (2006),

por exemplo, identificaram uma série de paleo-vales conectados às desembocaduras atuais dos principais rios da costa do estado e associaram estes vales a paleodrenagens. Aqui, é importante ressaltar que um dos paleo-vales indicados por estes autores é o de Itanhaém, o que representa mais um forte indício da existência de uma drenagem antiga nesta região.

No Estado do Rio de Janeiro, foram analisadas amostras de *M. microlepis* de três pontos de coleta, dois na bacia do rio Paraíba do Sul, nas cidades de Bom Jardim (riacho sem nome) e Teresópolis (rio Paquequer), e outro na bacia do rio Macacu, na cidade de Cachoeiras de Macacu, localidade tipo da espécie. Em cada uma destas localidades foi encontrado um haplótipo único e exclusivo. Apesar da proximidade dos três pontos de coleta (baseada na distância em km em linha reta), o não compartilhamento de haplótipos entre eles pode ser associado às características geomorfológicas do local. Segundo Aires *et al.* (2012), os rios Macacu e Paquequer, por exemplo, estão em domínios geomorfológicos distintos (ver Fig. 7, página 112). O primeiro drena, em seu alto curso, o domínio conhecido como “Serra do Mar (SMS, *Serra do Mar Scarp*)”, corre no sentido sul, passando pelo domínio “Baixada Fluminense (RJL, *Rio de Janeiro Lowland*)” (planície com altitude próxima ao do nível do mar) até desaguar no mar, na Baía de Guanabara. Já o rio Paquequer está no domínio “Platô de Teresópolis (TRH, *Teresópolis Highland*)” que está localizado ao norte do SMS e representa um platô com superfície ligeiramente inclinada a norte-noroeste. A cidade de Bom Jardim também está localizada no TRH. Assim, o rio Macacu está localizado em uma área de escarpa, mais baixa, enquanto que os afluentes do Paraíba do Sul amostrados estão acima desta escarpa, em área de platô e esta separação pode justificar o não compartilhamento de haplótipos entre estes rios. A geomorfologia local também pode ser responsável pela presença de haplótipos distintos no rio Paquequer e no riacho de Bom Jardim, apesar de ambos desembocarem no Paraíba do Sul. Estes representam afluentes independentes deste rio, que estão separados por três alinhamentos de cadeias montanhosas, de até 900-100 m, sobre o Platô de Teresópolis (Itaipava, Serra dos Órgãos e Lumiar) (Aires *et al.*, 2012), e esta separação pode explicar o não compartilhamento de haplótipos entre estes pontos.

Tanto a análise  $R_2$  quanto a abordagem Bayesiana de coalescência (BSP) indicaram expansão demográfica deste haplogrupo, que, segundo esta última análise, teria se iniciado por volta de 10 mil anos atrás (lembrando que estes resultados são referentes ao gene COI), que pode estar associada ao UMG. A relação entre os valores de  $\pi$  e latitude indicam uma tendência a esta expansão demográfica ter ocorrido a partir do sul em direção ao norte, visto que os maiores valores de  $\pi$  foram registrados nas bacias do HAP2\_sul.

### 5.3.3. Haplogrupo 3: considerações sobre distribuição, estrutura filogeográfica e história demográfica

O HAP3 é formado pelos haplótipos ocorrentes nas bacias dos rios Alto Tietê e Ribeira de Iguape, São Paulo, e em pequenas bacias costeiras do Estado do Paraná. Como já mencionado, apesar de *Mimagoniates microlepis* ser uma espécie típica de riachos da planície litorânea, já foi registrada também nas bacias dos rios Iguazu e Tibagi (e.g., Sant'Anna *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2008; Menezes & Weitzman, 2009), afluentes do alto curso do rio Paraná que drenam áreas de planalto do escudo cristalino brasileiro. A ocorrência da espécie na bacia do Alto Tietê, também afluente do rio Paraná, é, portanto, registrada pela primeira vez no presente estudo, no ribeirão Itaquaxiara, afluente do rio Embu-Mirim, na cidade de Itapeceira da Serra. A quantidade de informações a respeito da ictiofauna do rio Tietê disponível na literatura (e.g., Barrella & Petrere, 2003; Langeani *et al.*, 2007; Marceniuk *et al.*, 2011) aliada às inúmeras coletas já realizadas na bacia indicam que este foi o primeiro registro de *M. microlepis* nesta bacia (O. T. Oyakawa, comunicação pessoal). Recentemente (2012), em expedição visando coleta de material para o presente estudo, também foi coletado um indivíduo de *M. microlepis* na bacia do rio Embu-Guaçu, outro afluente do rio Tietê, na APA Capivari-Monos, São Paulo. Como não houve sucesso na amplificação dos genes deste exemplar único (em virtude de uma provável contaminação com formol), suas sequências não puderam ser analisadas no presente estudo. Ainda sobre a distribuição do HAP3, é interessante salientar que a única bacia costeira do Estado de São Paulo onde haplótipos deste grupo ocorrem é a bacia do Ribeira de Iguape e todos os haplótipos ocorrentes no Estado do Paraná são de pequenos riachos costeiros localizados em torno da Baía de Paranaguá, onde deságuam.

De acordo com as análises filogenéticas baseadas no mtDNA, indivíduos coletados no Alto Tietê estão mais relacionados aos de alguns afluentes do Ribeira de Iguape, que drenam o Estado de São Paulo. Este resultado difere do encontrado por Thomaz *et al.* (2015a) com relação a *Hollandichthys multifasciatus*, que sugere uma relação mais estreita entre os espécimes do Alto Tietê e os de uma drenagem costeira em Santos. Aqui, é válido ressaltar que estes autores incluíram na análise amostras de *H. multifasciatus* da bacia do Ribeira (coletados em São Paulo), mas estas resultaram como grupo irmão daqueles coletados em Guaraqueçaba, no Paraná. No presente estudo, inclusive, foram incluídas amostras de *M. microlepis* de Guaraqueçaba coletadas no mesmo ponto em que Thomaz *et al.* (2015a) coletaram (i.e., “arroio afluente do rio Tagaçaba”, *M. microlepis*, UFRGS 14698 e *H. multifasciatus*, UFRGS 11778 ) e a relação destes com indivíduos coletados no Ribeira de Iguape não ficou evidenciada. Sobre as

amostras desta bacia utilizadas na análise filogenética, é interessante notar que aquelas coletadas no seu alto curso, no Paraná, não formaram um grupo monofilético com aquelas do médio e baixo curso, amostradas no Estado de São Paulo. Este é um resultado relativamente esperado, visto que divergências em vários níveis têm sido encontradas entre a fauna de peixes das cabeceiras e a da foz de uma mesma bacia hidrográfica em estudos recentes (e.g., Sant'Anna *et al.*, 2006; Langeani *et al.*, 2007; Marceniuk *et al.*, 2011).

Assim como encontrado em relação ao HAP2, é possível distinguir uma quebra filogeográfica latitudinal mais específica dentro do HAP3, tendo como base os resultados da rede de haplótipos e a distribuição destes. Esta quebra, localizada à altura da cidade de Cananéia (SP), separa haplótipos de distribuição mais ao norte, ocorrentes na bacia do Alto Tietê e nos afluentes do Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo, daqueles do sul, ocorrentes no Paraná, tanto na bacia do Ribeira quanto nas drenagens costeiras da Baía de Paranaguá. No ribeirão Itaquaxiara, único afluente do Alto Tietê onde foi coletado *M. microlepis*, ocorrem dois haplótipos distintos e exclusivos desta localidade. Thomaz *et al.* (2015a) também coletaram amostras de *H. multifasciatus* em apenas uma localidade no Alto Tietê (única população da espécie de drenagem não-costeira) e também encontraram apenas um haplótipo. Este, diferentemente dos de *Mimagoniates*, foi compartilhado com uma população costeira próxima, em Santos, de maneira que Thomaz *et al.* (2015a) atribuíram a população do Tietê a uma paleodrenagem costeira nesta área. Aparentemente, esta paleodrenagem não influenciou a distribuição de *M. microlepis* neste trecho, visto que, apesar de não ter sido analisada nenhuma amostra da espécie coletada em Santos exatamente, foram analisados espécimes de áreas adjacentes e nenhum deles apontou para uma relação mais estreita com a bacia do Alto Tietê. No caso de *M. microlepis*, portanto, o isolamento desta população, ocorrente em Itapecerica da Serra, pode ter sido responsável pelo não compartilhamento de haplótipos com nenhuma drenagem adjacente, incluindo aqui as bacias costeiras menores (em Itanhaém, São Vicente, Mongaguá, HAP2) e a bacia do Ribeira de Iguape (HAP3).

A ocorrência e distribuição de haplótipos ao longo da bacia do Ribeira de Iguape são muito interessantes, uma vez que, nesta drenagem, foram registrados oito haplótipos distintos, claramente separados: (1) quatro deles no curso mais alto, restritos ao trecho amostrado da bacia no Estado do Paraná e (2) quatro deles em afluentes que desembocam no Ribeira já no Estado de São Paulo, nas cidades de Jacupiranga, Miracatu e Iguape (rios Pindaúba, Fau e Mumuna, respectivamente). Este segundo conjunto haplótipos é exclusivo da bacia do Ribeira de Iguape e são compartilhados entre suas diferentes localidades, com exceção de um deles, que é exclusivo do rio Mumuna. O compartilhamento de haplótipos neste trecho da bacia pode ser

associado à história geomorfológica da região, que indica que houve um cenário propício para ligação entre estes afluentes. Na faixa costeira da bacia do Ribeira de Iguape está localizada a “Planície Costeira Cananéia-Iguape”, uma das unidades geomorfológicas da bacia que se desenvolveu a partir das variações no nível do mar nos últimos 120 mil anos, através das transgressões e regressões marinhas (Ross, 2002), sendo estas últimas as principais responsáveis pelas paleoconexões entre afluentes do baixo curso do Ribeira, hoje isolados entre si. Já dos quatro haplótipos da bacia do Ribeira ocorrentes em seu trecho amostrado no Paraná, apenas um é exclusivo desta bacia, sendo três deles compartilhados com drenagens costeiras adjacentes, que desembocam na Baía de Paranaguá. Estes haplótipos foram amostrados no rio Capivari, na cidade de Bocaiúva do Sul (PR), em uma região conhecida como “Primeiro Planalto Paranaense”. Entre este ponto e a Baía de Paranaguá está localizada parte de uma importante falha geológica, conhecida como “Zona de Cisalhamento de Cubatão” (ver Saadi *et al.*, 2002: falha BR-44). Segundo as informações apresentadas por estes autores, esta é uma falha que tem importante papel no controle fluvial e que passou por uma série de eventos de movimentação, sendo o último deles bem recente, datado do Quaternário (<1,6 m.a.). A movimentação desta falha pode ter sido responsável pela conexão, em algum momento, de afluentes do alto curso do Ribeira e daqueles rios costeiros que drenam para a Baía de Paranaguá, o que justificaria o compartilhamento de haplótipos entre estas drenagens. Já o compartilhamento de haplótipos entre os riachos isolados e independentes, que deságuam na Baía de Paranaguá, é um resultado esperado levando em consideração o paleocenário proposto por Thomaz *et al.* (2015a). Segundo estes autores, todas as bacias em torno do estuário do Paranaguá fizeram parte da mesma paleodrenagem durante o UMG.

As relações filogenéticas e compartilhamentos de haplótipos envolvendo os indivíduos da bacia do Ribeira de Iguape e drenagens adjacentes são exemplos claros de que as bacias hidrográficas não devem ser consideradas, *a priori*, como uma unidade. De modo geral, a formação de sistemas de drenagens é dinâmica, assim o esperado para a ictiofauna de uma bacia é que esta seja composta, como resultado do acúmulo de diversos intercâmbios entre sistemas hidrográficos distintos e vizinhos ao longo do tempo geológico (Lima & Ribeiro, 2011). Estes intercâmbios podem, por exemplo, acontecer nas cabeceiras e nas proximidades da foz de maneira independente e com drenagens (ou trechos delas) distintas, o que pode resultar na composição diferencial da ictiofauna ao longo da mesma bacia hidrográfica. Esta ideia pode se aplicar também à diversidade genética, em especial no caso de espécies de peixes como *M. microlepis*, que não são migradoras, conforme foi indicado no presente estudo, tendo como base o não compartilhamento de haplótipos entre localidades do Ribeira de Iguape.

Apesar do teste de mudança no tamanho populacional ( $R_2$ ) ter indicado expansão demográfica significativa em relação ao HAP3, a mesma não foi corroborada pela análise de *Bayesian Skyline Plot*, que indicou declínio no tamanho efetivo desta população iniciado por volta de 10 mil anos atrás. Segundo Avise (2000), a maioria das populações varia seu tamanho efetivo ao longo do tempo, que vai desde década a milênios, e as principais causas para que esta variação resulte no declínio do Ne estão associadas a eventos periódicos naturais, tais como surtos de doenças ou catástrofes ambientais pontuais. Aqui, no entanto, é importante destacar dois pontos: o primeiro, já mencionado, diz respeito à utilização de apenas um marcador para realização da análise de BSP e o segundo, discutido por Heller *et al.* (2013), está associado ao problema desta análise em mostrar, em alguns casos, falsos sinais de declínio populacional quando utilizadas em populações estruturadas. Assim, a inclusão de mais marcadores na análise BSP se faz necessária para corroborar ou refutar a hipótese de declínio populacional, bem como discuti-la com propriedade caso seja corroborada.

#### **5.3.4. Haplogrupo 4: considerações sobre distribuição, estrutura filogeográfica e história demográfica**

De uma forma geral, os resultados obtidos em relação ao HAP4 de *Mimagoniates microlepis* foram os mais diferenciados em relação aos outros haplogrupos. Em primeiro lugar, foi neste agrupamento que foi detectado parafiletismo do mtDNA, conforme já discutido. Além disso, este haplogrupo, que representa o limite sul da distribuição de *M. microlepis*, foi o único proposto como monofilético também através de análises baseadas no gene nuclear RAG2. Ainda, foi apenas neste haplogrupo que as análises filogenéticas, de GMYC e rede de haplótipos foram congruentes na proposição de dois filogrupos: HAP4\_norte, que inclui as bacias dos rios Iguaçu e Tibagi (afluentes do rio Paraná), além de drenagens costeiras do Paraná e Santa Catarina e o HAP4\_sul, que inclui as bacias dos rios Mampituba e Tramandaí. Como pode ser observado no mapa (Fig. 2), há um *gap* na distribuição de *M. microlepis* entre estes dois filogrupos, no Estado de Santa Catarina, que representa uma falha de amostragem do presente estudo, visto que há registro da espécie em riachos desta região (*e.g.*, Menezes & Weitzman, 2009; Abrahão *et al.*, 2015).

O primeiro registro de *M. microlepis* em uma drenagem não costeira foi no alto curso da bacia do rio Iguaçu, um afluente direto do rio Paraná, próximo a Curitiba (PR) (Weitzman *et al.*, 1988). Estes autores, e posteriormente Menezes & Weitzman (1990), atribuíram a ocorrência da espécie no Iguaçu a duas possíveis causas, uma não natural, associada à introdução humana

ou uma natural, devido ao contato desta bacia com drenagens costeiras adjacentes onde a espécie ocorre (no caso, o Ribeira de Iguape) em um evento de captura de cabeceiras. A hipótese de introdução, apesar de não estar completamente descartada, não tem sido muito discutida na literatura, especialmente depois que a espécie foi também coletada no rio Tibagi (Sant'Anna *et al.*, 2006), um tributário do rio Paranapanema, outro importante afluente da bacia do rio Paraná. A margem leste da América do Sul apresenta uma série de zonas propensas à atividades e deformações tectônicas, que resultam em uma série de alterações hidrológicas, sendo a captura de cabeceiras uma das principais destas alterações (Ribeiro, 2006). Diz-se que houve captura de drenagens quando parte (no geral, as cabeceiras) ou a totalidade de um determinado rio é desviada para um sistema de drenagem vizinho (Bishop, 1995; Wilkinson *et al.*, 2006). Estas capturas, que podem ser resultado do efeito direto da pressão tectônica ou de uma erosão diferencial, representam um importante evento vicariante e, ao mesmo tempo, de dispersão da fauna aquática (Lima & Ribeiro, 2011; Dagosta *et al.*, 2014). Assim, contínuos processos de capturas de rios/riachos ao longo da história da América do Sul têm sido sugeridos como uma das principais fontes de eventos vicariantes e, conseqüentemente, uma das principais causas de diversificação no continente sul-americano (Ribeiro, 2006; Buckup, 2011; Lima & Ribeiro, 2011; Dagosta *et al.*, 2014), além de ser uma das principais justificativas para compartilhamento de fauna entre drenagens adjacentes, mas independentes (*e.g.*, Ribeiro, 2006; Dagosta *et al.*, 2014). Assim, Menezes *et al.* (2008) atribuem a ocorrência de *M. microlepis* no alto curso dos rios Iguaçu e Tibagi a eventos independentes de intercâmbio de fauna entre rios costeiros e bacias do escudo cristalino brasileiro através de capturas de drenagens.

Segundo Ribeiro (2006) e Menezes *et al.* (2008), o intercâmbio de fauna entre afluentes da bacia do rio Paraná (especificamente o Iguaçu) e drenagens costeiras seria decorrente das atividades tectônicas na região do Arco de Ponta Grossa, formação geológica cujas falhas reconhecidamente influenciam o padrão de drenagens e relevo da região (Melo, 2002; Franco-Magalhães, 2010). Weitzman *et al.* (1988), Menezes & Weitzman (1990) e, mais recentemente, Menezes *et al.* (2008) sugerem que a captura de drenagens entre a bacia do rio Paraná e rios costeiros tenha se dado a partir da bacia do Ribeira de Iguape, o que justificaria o compartilhamento de uma séries de espécies de peixes entre estas bacias, além de *M. microlepis*. A hipótese destes autores se baseia, principalmente, no fato do Arco de Ponta Grossa está localizado na região drenada pelas cabeceiras dos rios Paranapanema, Iguaçu e Ribeira de Iguape. Já Ingenito *et al.* (2004) sugerem que, apesar de haver indícios geomorfológicos fortes de um possível contato entre o Ribeira de Iguape e o Iguaçu, a

proximidade desta última com aquelas de rios costeiros do Paraná, aliada ao compartilhamento de espécies de peixes entre estas bacias, indica que pode ter havido uma relação histórica entre estes sistemas. Os resultados obtidos em todas as análises realizadas no presente estudo concordam com a hipótese de Ingenito *et al.* (2004), visto que os indivíduos coletados nos rios Iguaçu e Tibagi são mais proximamente relacionados aqueles de pequenas drenagens costeiras do Paraná (HAP4) do que aqueles coletados no Ribeira de Iguape, mesmo em sua cabeceira (HAP3). Ainda sobre a ocorrência de *M. microlepis* no Iguaçu e Tibagi, é interessante destacar que estas duas bacias apresentaram e compartilharam o mesmo haplótipo, que também é exclusivo. Este compartilhamento corrobora a hipótese de Menezes *et al.* (2008) de que eventos de capturas de cabeceiras entre rios costeiros e rios que drenam o escudo cristalino brasileiro também deve ter ocorrido com o rio Tibagi, assim como sugerido para o Iguaçu. Na ocasião da publicação deste trabalho, os autores não tinham analisado material do Tibagi especificamente e deixaram a questão em aberto para ser respondida futuramente. O compartilhamento de *M. microlepis* entre os rios Tibagi/Iguaçu e as bacias costeiras do Paraná e Santa Catarina são um indicativo de que houve intercâmbio de fauna entre estas bacias, provavelmente devido a capturas de drenagens, mas o não compartilhamento de haplótipos entre os rios Iguaçu/Tibagi e estas mesmas bacias indicam que este intercâmbio ocorreu há tempo suficiente para as populações se estruturarem.

A maioria dos haplótipos ocorrentes nas bacias costeiras do Paraná (ao sul da Baía de Paraguá) e Santa Catarina é compartilhada entre estas bacias e este compartilhamento pode ser justificado pela hipótese de paleodrenagens de Thomaz *et al.* (2015a). Segundo estes autores, todas as bacias costeiras, atualmente independentes, situadas ao sul do estuário de Paranaguá, no Paraná, até mais ou menos a bacia do rio Itajaí (incluindo esta) em Santa Catarina, fizeram parte da mesma paleodrenagem no UMG. Ainda de acordo com estes autores, bacias deste último estado, situadas à altura de Florianópolis fizeram parte de uma paleodrenagem diferente, mas, como não foi analisado material de *M. microlepis* desta região, não foi possível corroborar ou refutar esta segunda hipótese.

No Rio Grande do Sul, foram coletados espécimes de *M. microlepis* nas bacias dos rios Mampituba (também em SC), Três Forquilhas e Maquiné, sendo que cada uma destas localidades apresentou um haplótipo único e exclusivo. Os rios Maquiné e Três Forquilhas correm de maneira independente em diferentes vales da Serra Geral, mas se conectam próximo às suas respectivas foz através de lagoas de água doce (Lagoa dos Quadros e Lagoa Itapeva) e pequenos canais, formando a bacia do rio Tramandaí (Hirschmann *et al.*, 2015). O rio Mampituba, que tem suas nascentes na cidade de Praia Grande, em SC (onde foram coletadas

amostras de *M. microlepis*), é uma drenagem independente, que deságua diretamente no Oceano Atlântico. Malabarba & Isaia (1992) e, mais recentemente, Malabarba *et al.* (2013), sugerem uma origem histórica comum da ictiofauna dos rios Maquiné, Três Forquilhas, Mampituba e Araranguá (rio costeiro que drena o extremo sul de SC), tendo como base a composição e distribuição da fauna de peixes de água doce destas drenagens. Uma história compartilhada destas bacias foi também proposta por Thomaz *et al.* (2015a), que sugeriram que elas fizeram parte da mesma paleodrenagem no UMG. Os resultados obtidos no presente estudo com relação a *M. microlepis*, no entanto, apontam para algumas peculiaridades entre estas bacias, interessantes de serem discutidas. Em primeiro lugar, apesar de fazerem parte da mesma bacia, não houve compartilhamento de haplótipos entre os rios Três Forquilhas e Maquiné, que também não formaram um grupo monofilético tendo como base o mtDNA. Recentemente, Hirschmann *et al.* (2015) analisaram o padrão filogeográfico de *Diapoma itaimbe* (Malabarba & Weitzman), espécie da família Characidae endêmica dos rios Araranguá, Mampituba e Tramandaí, para testar se lagoas costeiras de água doce podem afetar a distribuição de espécies de peixes da planície costeira. De acordo com estes autores, as bacias dos rios Três Forquilhas e Maquiné não compartilham haplótipos de *D. itaimbe* entre si, assim como encontrado para *M. microlepis* no presente estudo. Hirschmann *et al.* (2015) sugerem, portanto, que lagoas costeiras podem sim representar barreiras ao fluxo gênico entre as bacias e sugerem que as paleoconexões ocorridas em virtude do recuo do nível do mar nos períodos glaciais podem ter sido seletivas, podendo não representar um corredor de dispersão para toda a fauna de peixes de todas as bacias. Os resultados obtidos no presente estudo em relação a *M. microlepis* corroboram esta hipótese e indicam que apesar das paleoconexões entre as bacias dos rios Maquiné e Três Forquilhas bem como a conexão atual via lagoas de água doce, as populações destes dois rios permanecem isoladas, como sugerido por Hirschmann *et al.* (2015) em relação a *D. itaimbe*. Estes autores atribuem a ausência da espécie nas lagoas costeiras que conecta as duas bacias a características ambientais destas: tanto a Lagoa dos Quadros quanto a Itapeva apresentam elevada turbidez e temperatura e *D. itaimbe* é uma espécie típica de águas claras e frias. Apesar de *M. microlepis* apresentar menos restrições ambientais, a espécie também não foi registrada em lagoas e, na região, também ocorre em locais de água límpida e fria (Malabarba *et al.*, 2013), de maneira que estas lagoas também podem estar funcionando como barreira para as populações dos rios Maquiné e Três Forquilhas.

Por outro lado, as bacias dos rios Mampituba e Três Forquilhas compartilharam haplótipos de *D. itaimbe* entre si e Hirschmann *et al.* (2015) atribuíram este compartilhamento a duas possíveis causas: ou é resultado de uma relação ancestral entre estas populações ou do

fluxo gênico recente devido eventos de captura de cabeceiras. Com relação a *M. microlepis*, no entanto, o resultado encontrado foi diferente e cada uma destas drenagens apresentou um haplótipo exclusivo. Este resultado favorece a primeira hipótese de Hirschmann *et al.* (2015), mas não exclui por completo a segunda por diversas razões, a captura pode ter sido de um pequeno riacho onde não ocorria *M. microlepis*, ou esta espécie pode ter simplesmente respondido de maneira diferente à “mistura” destas populações, o que seria um resultado esperado visto que espécies diferentes evoluem de forma diferente.

Apesar do teste de mudança no tamanho populacional ( $R_2$ ) ter indicado expansão demográfica significativa em relação ao HAP4, a mesma não foi corroborada pela análise de BSP que indicou estabilidade no tamanho efetivo desta população ao longo dos últimos 100 mil anos. Este resultado, como já mencionado, deve ser interpretado com cautela, visto que apenas o gene COI foi utilizado nesta última análise. Assim, a inclusão de mais marcadores na análise BSP se faz necessária para corroborar ou refutar a hipótese encontrada no presente estudo.

#### **5.4. Comparação entre os resultados do presente estudo e análise filogeográfica prévia realizada com *Mimagoniates microlepis***

Por ocasião da realização de sua dissertação de mestrado, Ribeiro (2006) realizou uma análise filogeográfica de *Mimagoniates microlepis* através do protocolo RAPD (do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*) e tendo como base amostras de 100 indivíduos de drenagens costeiras de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, além de exemplares do rio Iguazu (total = 10 localidades). Os resultados obtidos nesta dissertação foram, posteriormente, publicados por Torres & Ribeiro (2009), mas, em 2008, parte deles foram apresentados e discutidos no trabalho de Menezes *et al.* (2008) sobre a biogeografia de Glandulocaudini (na época, Glandulocaudinae), do qual R. A. Torres é co-autor. Aqui, é importante ressaltar que, como a fonte de dados dos dois é a mesma e os resultados são idênticos, será mencionado, na maioria das vezes, apenas o trabalho de Torres & Ribeiro (2009), que teve como foco *M. microlepis*.

A primeira diferença entre estes estudos diz respeito à técnica utilizada para obtenção dos dados. No presente estudo, foi utilizada a técnica de sequenciamento de DNA enquanto Torres & Ribeiro (2009) utilizaram a técnica do “DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente” (RAPD, do inglês *Randon Amplified Polymorphic DNA*). Apesar de uma série de vantagens do RAPD (que incluem baixo custo, rapidez, necessidade de pouco DNA, por exemplo) e da sua ampla utilização em estudos envolvendo peixes (Lupchinski-Jr., 2006), esta

técnica tem sido criticada principalmente pela dificuldade de repetição dos mesmos resultados (Avisé, 2004) e, segundo alguns autores (e.g., Barman *et al.*, 2003), estes devem ser interpretados com cautela, especialmente no que diz respeito às conclusões a respeito da sistemática do grupo analisado. Em nenhuma das topologias obtidas, baseada em Inferência Bayesiana por Menezes *et al.* (2008) e obtidas por *Neighbor-Joining* e Máxima Parcimônia por Torres & Ribeiro (2009), *M. microlepis* aparece como parafilética, mesmo as sequências de *M. lateralis* terem sido usadas como grupo externo. Não é possível comparar com propriedade este resultado com aquele obtido no presente estudo, em função da técnica utilizada por aqueles autores para obtenção destes resultados, uma vez que com o RAPD não é possível determinar se a amplificação foi de parte do genoma mitocondrial ou nuclear. Diferentemente do obtido no presente estudo, Torres & Ribeiro (2009) encontraram maiores valores de diversidade genética nas populações do litoral de São Paulo, que foram atribuídas por estes autores como sendo as mais antigas, indicando que a ampliação da distribuição da espécie se deu no sentido norte-sul.

A principal concordância entre os dois estudos diz respeito aos resultados gerais: ambos encontraram uma elevada taxa de diversidade genética e forte estruturação filogeográfica em *M. microlepis* e indicam que este pode se tratar de um nome para abrigar mais de uma espécie. Os autores supracitados associam o padrão de distribuição de *M. microlepis* tanto a eventos de captura de cabeceiras quanto às flutuações no nível do mar, como também feito no presente estudo. Como Torres & Ribeiro (2009) não apresentam rede de haplótipos, não foi possível comparar os resultados obtidos a partir desta abordagem. Em São Paulo, Torres & Ribeiro (2009) analisaram espécimes de Mongaguá e Itariri, que resultaram como mais relacionados. Apesar de não ter sido incluído material de Itariri no presente estudo, a proximidade desta cidade com Peruíbe (de onde foi analisado material) indica uma possível concordância entre os dois estudos em relação à formação do HAP2. Os indivíduos equivalentes ao HAP3 do presente estudo analisados por Torres & Ribeiro (2009) também formaram um grupo monofilético. E estes autores também encontraram relação mais estreita entre os indivíduos do HAP3 e HAP4 do presente estudo. Dentro do HAP4, Torres & Ribeiro (2009) também encontraram relação mais estreita entre os indivíduos coletados em bacias costeiras do Paraná e Santa Catarina e aqueles das cabeceiras do rio Iguaçu. Apesar de Menezes *et al.* (2008) terem chamado atenção para a necessidade de inclusão de material do rio Tibagi para uma compreensão mais completa da história filogeográfica de *M. microlepis*, Torres & Ribeiro (2009) não o fizeram. Assim, material desta bacia é analisado pela primeira vez no presente estudo.

## 5.5. Análises morfológicas

De uma forma geral, os dados merísticos, morfométricos e de colorido indicam sobreposição de valores e padrão entre os haplogrupos e entre estes e *Mimagoniates microlepis sensu stricto*, o que não justifica o reconhecimento de mais de uma espécie para as diferentes populações analisadas. Apesar de ter sido observada variação clinal de alguns caracteres por Menezes & Weitzman (2009: Figs. 89 e 90, páginas 362 e 363) (e.g., número de raios ramificados na nadadeira anal, número de escamas perfuradas na linha lateral), esta variação foi detectada em menor escala no presente estudo. Este resultado pode ser consequência da inclusão de espécimes de distribuição intermediária à análise, uma vez que a variação clinal, i.e., mudança gradual de fenótipo ao longo da distribuição de uma espécie/população, está normalmente relacionada à transição geográfica (Huxley, 1938). Aqui, é importante ressaltar que Menezes & Weitzman (2009) agruparam as amostras analisadas de acordo com as sub-regiões biogeográficas propostas por Menezes (1988) em relação a algumas bacias costeiras do leste do Brasil e, apesar dos limites não serem idênticos, estas correspondem também à área ocupada pelos diferentes haplogrupos aqui propostos. Apesar de nem sempre ser observada um clina evidente, é possível perceber, nos gráficos de *BoxPlot*, que o HAP1 tende a ter menores valores em relação aos caracteres merísticos avaliados. Os maiores valores, geralmente, ficam entre os HAP2 e HAP4. A sobreposição de valores, no entanto, é alta o suficiente para não ser possível separar os haplogrupos tendo como base os caracteres merísticos utilizados.

Sobre o colorido em álcool, Menezes & Weitzman (2009: página 360) afirmam que “ocorre alguma variação entre amostras de áreas isoladas ao longo da distribuição da espécie”. Esta variação, entretanto, não foi evidenciada no presente estudo (Fig. 20). A mancha umeral e a faixa lateral são mais evidentes em alguns indivíduos do que em outros, mas esta variação não foi relacionada a nenhum haplogrupo, podendo ser observada, inclusive, entre espécimes do mesmo lote. Aqui, são apresentadas fotografias em vida de um topótipo (HAP2) e um indivíduo do HAP1 (Fig. 22) e estas não indicam variação significativa. Menezes & Weitzman (2009: página 361) descreveram o colorido em vida da espécie com base em um exemplar da Baía de Guaratuba, no Paraná, que seria equivalente ao HAP4, e o padrão é o mesmo. Em relação ao HAP3, apesar de não ter registro fotográfico, o colorido em vida do espécime coletado no Embu-Mirim (Alto Tietê) durante o presente estudo foi registrado em caderno de campo e é o mesmo observado para os demais haplogrupos. Assim, o cruzamento destas informações indica que o colorido em vida de *M. microlepis* também não varia significativamente entre os diferentes haplogrupos. Em relação ao dimorfismo sexual, é importante destacar que todos os caracteres levantados por Menezes & Weitzman (2009) nas

seções ‘Descrição’ e ‘Dimorfismo sexual’ foram encontrados nos diferentes haplogrupos, sem diferença significativa entre eles.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a variação morfológica observada nos caracteres utilizados não corresponde à variação molecular proposta pelas análises baseadas no mtDNA. Como já mencionando anteriormente, a grande divergência genética entre linhagens que são morfológicamente indistinguíveis é uma forte evidência de que o táxon em questão é uma espécie críptica (Costa-Silva *et al.*, 2015). Apesar da utilização combinada de dados morfológicos e moleculares ter fornecido fortes evidências que embasaram a descrição de novas espécies de peixes de água doce neotropicais, tradicionalmente consideradas como crípticas (*e.g.*, Benine *et al.*, 2009;. Melo *et al.*, 2011;. Amaral *et al.*, 2013;.. Silva *et al.*, 2013), nem sempre é possível separar morfológicamente estas espécies e os autores optam por mantê-las sob o mesmo nome até que esta separação seja possível (*e.g.*, Costa-Silva *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2016). Esta também foi a decisão tomada no presente estudo que, como já mencionado, pode parecer conservadora, mas foi considerada a mais acertada do ponto de vista taxonômico, pelas razões já discutidas.

## 6. Conclusões

No presente estudo, foram utilizadas fontes de dados e abordagens metodológicas variadas para a melhor compreensão da história evolutiva de *Mimagoniates microlepis*, uma espécie de peixe de água doce endêmica de rios e riachos da Mata Atlântica. Análises de identificação molecular de espécies (GMYC e *DNA barcoding*), baseadas no gene mitocondrial COI, indicaram a existência de, no mínimo, quatro linhagens dentro de *M. microlepis*, com divergência suficiente para separação em espécies distintas. As análises morfológicas realizadas, no entanto, não corroboraram estes resultados e o nome *M. microlepis* foi mantido para as diferentes populações alopátricas, distribuídas no leste do Brasil, desde a bacia do rio Pardo, na Bahia, até a bacia do rio Tramandaí, no Rio Grande do Sul. Baseado na incongruência entre dados morfológicos e moleculares, *M. microlepis*, tal como conceituada atualmente, é representada por um conjunto de populações (= haplogrupos), que poderiam ser caracterizadas como espécies crípticas. Em função das divergências genéticas acentuadas, sugere-se, no entanto, que, para fins de conservação, as linhagens evolutivas distintas sejam levadas em consideração.

As análises filogenéticas baseadas no mtDNA (COI e 16S) indicaram que a espécie *M. microlepis* não é monofilética, em virtude da relação mais estreita de um dos seus haplogrupos

com *M. lateralis*. Como as análises baseadas no gene nuclear RAG2 e a árvore de espécies indicam o contrário e recuperam *M. microlepis* como um clado, o parafiletismo do mtDNA sugere a ocorrência de introgressão mitocondrial entre esta população específica e *M. lateralis*. Análises moleculares baseadas no mtDNA (filogenéticas e filogeográficas) também indicam uma forte estruturação ao longo da distribuição de *M. microlepis*, com distinção clara de quatro haplogrupos. Esta estruturação não foi recuperada através dos resultados obtidos com a análise do nDNA, sugerindo a necessidade de um marcador nuclear de evolução mais rápida que o RAG2 para análise intraespecífica/populacional.

Os quatro haplogrupos supracitados foram definidos no sentido norte-sul como (1) Haplogrupo 1, ocorrente em drenagens costeiras da Bahia e Espírito Santo; (2) Haplogrupo 2, em bacias costeiras do Rio de Janeiro, incluindo localidade tipo, e São Paulo; (3) Haplogrupo 3, nas bacias dos rios Tietê (afluente do rio Paraná) e Ribeira de Iguape, além de drenagens costeiras do Paraná; e (4) Haplogrupo 4, ocorrente em bacias costeiras de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além das bacias dos rios Iguaçu e Tibagi (afluentes do Paraná). O não compartilhamento de haplótipos entre estes agrupamentos apontam para três quebras filogeográficas na Mata Atlântica, associadas a algumas bacias hidrográficas que drenam este domínio: (1) ao norte do rio Doce, no Espírito Santo; (2) à altura da bacia do rio Peruíbe, litoral sul de São Paulo; (3) ao sul da Baía de Paranaguá, no Paraná. Parte destas quebras é congruente com aquelas verificadas em outras espécies de peixes de água doce e também em grupos da biota terrestre. Para o estabelecimento de um padrão geral, no entanto, estudos adicionais se fazem necessários, especialmente envolvendo a fauna aquática.

Mesmo havendo uma estruturação e padrão geral, as análises internas de cada haplogrupo indicam nuances e quebras filogeográficas ainda mais específicas, que são indicativas da complexidade da história evolutiva de *M. microlepis*. As divergências entre os quatro grandes haplogrupos datam do Neógeno (antigo Terciário), enquanto as divergências internas, entre populações distintas de cada um deles, são mais recentes, datando do Pleistoceno (Quaternário). Estas datações, aliadas às informações geomorfológicas disponíveis às áreas onde a espécie ocorre, bem como à hipótese da existência de paleodrenagens associadas ao Último Máximo Glacial proposta para a região, indicam que o atual padrão de distribuição de *M. microlepis* foi, provavelmente, moldado tanto por eventos mais antigos de capturas de cabeceiras, por exemplo, quanto por eventos mais recentes diretamente associados às flutuações do nível do mar, ocorridas no Pleistoceno. As análises de demografia histórica fornecem indícios de que as populações mais antigas de *M. microlepis* tenham se estabelecido em drenagens mais ao sul, indicando que a origem da diversificação da espécie tenha se dado

nestas drenagens, com posterior expansão populacional no sentido norte. Este resultado é congruente com hipóteses prévias de origem e diversificação de Glandulocaudini como um todo, mas discordante do que foi proposto especificamente em relação a *M. microlepis*, tendo como base um estudo filogeográfico já desenvolvido anteriormente com a mesma espécie, porém realizado com um número consideravelmente menor de amostras e localidades, utilizando um protocolo de amplificação e abordagens analíticas diferentes daqueles utilizados no presente trabalho, o que pode ter gerado a incongruência observada.

Assim, em função de tudo o que foi apresentado, discutido e mencionado anteriormente, os resultados do presente estudo corroboram a ideia de que, dada a complexidade associada ao surgimento e delimitação de espécies, quanto mais informações e fontes de dados distintas forem utilizadas, melhor e mais completo será o conhecimento da sua história evolutiva. Este conhecimento, por sua vez, é crucial para a elaboração de políticas de conservação responsáveis e eficientes, extremamente importantes para a manutenção da biodiversidade, objetivo maior de quaisquer estudos na área de ciências biológicas.

## 7. Referências Bibliográficas

- Abrahão, V. P., A. Claro-García, L. Souza-Shibatta & O. A. Shibatta. 2015. Rapid survey of ichthyofauna from rivers and streams of coastal hydrographic regions of Santa Catarina state, Brazil. **Check List**, 11(5): 1-13.
- Ahmadzadeh, F., M. Flecks, M. A. Carretero, O. Mozaffari, W. Böhme, D. J. Harris, S. Freitas & D. Rödder. 2013. Cryptic Speciation Patterns in Iranian Rock Lizards Uncovered by Integrative Taxonomy. **PLoS ONE**, 8(12): e80563. doi:10.1371/journal.pone.0080563
- Aires, J. R., A. Motoki, K. F., Motoki, A. F. Motoki & J. G. Ribeiro. 2012. Análises Geomorfológicas do Platô de Teresópolis e da Serra do Mar, RJ, com o Auxílio de Seppômen e ASTER GDEM e sua Relação aos Tectonismos Cenozoicos. **Anuário do Instituto de Geociências – UFRJ**, 35(2): 105-123.
- Akihito, F. A., Y. Ikeda, M. Aizawa, S. Nakagawa, Y. Umehara, T. Yonezawa, S. Mano, M. Hasegawa, T. Nakabo, T. Gojobori. 2016. Speciation of two gobioid species, *Pterogobius elapoides* and *Pterogobius zonoleucus* revealed by multi-locus nuclear and mitochondrial DNA analyses. **Gene**, 576: 593-602.
- Aleixo, A. 2009. Conceitos de espécie e suas implicações para conservação. **Megadiversidade**, 5(1-2): 87-95.

- Álvarez-Presas, M., A. Sánchez-Gracia, F. Carbayo, J. Rozas & M. Riutort. 2014. Insights into the origin and distribution of biodiversity in the Brazilian Atlantic forest hot spot: a statistical phylogeographic study using a low-dispersal organism. **Heredity**, 112: 656-665.
- Amaral, C. R. L., P. M. Brito, D. A. Silva & E. F. Carvalho. 2013. A new cryptic species of South American freshwater pufferfish of the genus *Colomesus* (Tetraodontidae), based on both morphology and DNA data. **PLoS One**, 8: e74397.
- Amaral, F. R., P. K. Albers, S. V. Edwards & C. Y. Miyaki. 2013. Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic Forest antbirds (*Myrmeciza*). **Molecular Ecology**, 22(15): 3996-4013.
- April, J., R. L. Mayden, R. H. Hanner, L. Bernatchez. 2011. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. **PNAS**, 108(26): 10602-10607.
- Avice, J. C. 2000. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge, Harvard University Press, 464p.
- Avice, J. C. 2004. **Molecular markers, Natural history, and Evolution**. Massachusetts, Sinauer Associates Inc. 684p.
- Avice, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36: 3-15.
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Jr, Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 489-522.
- Azevedo, M. A., C. B. Fialho & L. R. Malabarba. 2016. Reproductive strategies in two inseminating species of Glandulocaudini, *Mimagoniates microlepis* and *Mimagoniates rheocharis* (Characiformes: Characidae: Stevardiinae). **Journal of Fish Biology**, 1-14.
- Bachtrog, D., K. Thornton, A. Clark & P. Andolfato. 2006. Extensive introgression of mitochondrial dna relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group. **Evolution**, 60(2): 292-302.
- Ballard, J. W. & M. Whitlock. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, 13: 729-744.
- Bandelt, H. J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16(1): 37-48.
- Barman, H. K., A. Barat, B. M. Yadav, S. Banerjee, P. K., Meher, P. V. G. K. Reddy & R. K. Jana. 2003. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. **Aquaculture**, 217: 115-123.

- Barrella, W. & M. Petrere. 2003. Fish community alterations due to pollution and damming in Tietê and Paranapanema rivers, Brazil. **River Research and Applications**, 19: 59-76.
- Batalha-Filho, H. & C. Y. Miyaki. 2011. Filogeografia da Mata Atlântica. **Revista da Biologia**, volume especial Biogeografia: 31-34.
- Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A. M, Campos, L. A. O., Tavares, M. G. e Fernandes-Salomão, T. M. 2010. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. **Apidologie**: 534-547.
- Batalha-Filho, H. & C. Y. Miyaki. 2016. Late Pleistocene divergence and postglacial expansion in the Brazilian Atlantic Forest: multilocus phylogeography of *Rhopias gularis* (Aves: Passeriformes). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, doi: 10.1111/jzs.12118.
- Bauer, A.M., Parham, J.F., Brown, R.M., Stuart, B.L., Grismer, L., Papenfuss, T.J., Böhme, W., Savage, J.M., Carranza, S., Grismer, J.L., Wagner, P., Schmitz, A., Ananjeva, N.B., Robert, F., 2011. Availability of new Bayesian-delimited gecko names and the importance of character-based species descriptions. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 278: 490-492.
- Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. K. L. Ng, R. Meier, K. Winkler, K. K., Ingram & I. Das. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, 22, 148-155.
- Bishop, P. 1995. Drainage rearrangement by river capture, beheading and diversion. **Progress in Physical Geography**, 19: 449-473.
- Bock, W. 1986. Species concepts, speciation, and macroevolution. *In*: Iwantsuki, K., P. Raven & W. Bock (Eds.). **Modern Aspects of Species**. Tokyo, University of Tokyo Press, p. 31-57.
- Borba, R. S., C. H. Zawadzki, C. Oliveira, A. Perdices, P. P. Parise-Maltempi & A. L. Alves. 2013. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. **Neotropical Ichthyology**, 11(1): 111–116.
- Bouckaert, R. R. & J. Heled. 2014. **DensiTree 2: seeing trees through the forest**. bioRxiv, <http://dx.doi.org/10.1101/012401>.
- Beheregary, L. B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, 17: 3754–3774.
- Benine, R. C., T. C. Mariguela, C. Oliveira. 2009. New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, 7: 161-168.

- Bermingham, E. & Moritz, C. 1998. Comparative Phylogeography: concepts and applications. **Molecular Ecology**, 7: 367-369.
- Bizerril, C. R. S. F. 1994. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. **Acta Biologica Leopoldensia**, 16: 51-80.
- Braga, M. R., J. R. S. Vitulen & J. M. R. Aranha. 2007. Estrutura populacional de *Mimagoniates microlepis* (Steindachner 1876) (Characidae, Glandulocaudinae) em um riacho de Floresta Atlântica, Paraná (Brasil). **Acta Biologica Paranaense**, 36: 67-81.
- Brunes, T. O., F. Sequeira, C. F. B. Haddad, J. Alexandrino. 2010. Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 57: 1120-1133.
- Brunes, T. O., J. Alexandrino, D. Baêta, J. Zina, J., C. F. B. Haddad. & F. Sequeira. 2014. Species limits, phylogeographic and hybridization patterns in Neotropical leaf frogs (Phyllomedusinae). **Zoologica Scripta**, 43(6): 586-604.
- Brunes, T. O., M. T. Thomé, J. Alexandrino, C. F. B. Haddada & F. Sequeira. 2015. Ancient divergence and recent population expansion in a leaf frog endemic to the southern Brazilian Atlantic forest. **Organisms Diversity & Evolution**, 15(4): 695-710.
- Buckup, P. A. 1996. Biodiversidade dos Peixes da Mata Atlântica. *In*: **Workshop Padrões de Distribuição da Diversidade da Mata Atlântica do Sul e Sudeste Brasileiro**.
- Buckup, P. A. 2011. The Eastern Brazilian Shield. *In*: Albert, J. S. & R. E. Reis (Eds.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley, University of California Press, cap. 12, p. 203-210
- Burns, J. R., S. H. Weitzman, H. J. Grier, H. J. & N. A. Menezes. 1995. Internal fertilization, testis and sperm morphology in glandulocaudine fishes (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae). **Journal of Morphology**, 210: 45-53.
- Cabanne, G. S., E. H. Sari, D. Meyer, F. R. Santos & C. Y. Miyaki. 2013. Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic Greenish *Schiffornis Schiffornis virescens* (Aves: Tityridae). **Journal of Ornithology**, 154: 371-384.
- Cabanne, G. S, F. M. d'Horta, E. H. R. Sari, F. R. Santos & C. Y Myiaki. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49: 760-773.

- Calcagnotto, D. 2012. Taxas de evolução e relógios moleculares. *In*: Matioli, S. R. & Fernandes, F. M. C. (Eds.). **Biologia molecular e Evolução**. Ribeirão Preto, Holos/Sociedade Brasileira de Genética, cap. 7, p. 61-74.
- Calcagnotto, D., S. A. Schaefer & R. DeSalle. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36:135-153.
- Camelier, P. & A. M. Zanata. 2014. Biogeography of freshwater fishes from the Northeastern Mata Atlântica freshwater ecoregion: distribution, endemism, and area relationships. **Neotropical Ichthyology**, 12(4): 683–698.
- Campanha, G. A. C., H. H. Ens & W. L. Poçano. 1994. Análise morfotectônica do planalto do Juqueriquerê, São Sebastião. **Revista Brasileira de Geociências**, 24(1): 32-42.
- Campos-Soto, R., F. Torres-Pérez & A. Solari. 2015. Phylogenetic incongruence inferred with two mitochondrial genes in *Mepraia* spp. and *Triatoma eratyrusiformis* (Hemiptera, Reduviidae). **Genetics and Molecular Biology**, 38(3): 390-395.
- Cardoso, D. C., M. P. Cristiano, M. G. Tavares, C. D. Schubart & J. Heinze. 2015. Phylogeography of the sand dune ant *Mycetophylax simplex* along the Brazilian Atlantic Forest coast: remarkably low mtDNA diversity and shallow population structure. **BMC Evolutionary Biology**, 15: 1-13.
- Carnaval, A. C., M. J. Hickerson, C. F. B. Haddad, M. T. Rodrigues & C. Moritz. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, 323: 785-789.
- Carvalho, T. P. 2007. Distributional patterns of freshwater fishes in coastal Atlantic drainages of eastern Brazil: A preliminary study applying parsimony analysis of endemism. **Darwiniana**, 45: 65-67.
- Carvalho, D., 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(S1): 80–86.
- Castella, V., M. Ruedi & L. Excoffier. 2001. Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. **Journal of Evolutionary Biology**, 14: 708-20.
- Chaves, J. A. & T. B. Smith. 2011. Evolutionary patterns of diversification in the Andean hummingbird genus *Adelomyia*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 60: 207-218.
- Colombi, V. H., S. R. Lopes & V. Fagundes. 2011. Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. **Genetics and Molecular Biology**, 33(4): 785-789.

- Conti, L. A. 2009. Evidências da evolução dos sistemas de paleodrenagens na plataforma continental da região de São Sebastião (Litoral Norte do Estado de São Paulo). **Revista Brasileira de Geomorfologia**, 10(2): 45-55.
- Conti, L. A. & V. V. Furtado. 2006. Geomorfologia da Plataforma Continental do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Geociências**, 32: 12-31.
- Costa, W. J. E. M. 2002. **Peixes anuais brasileiros: diversidade e conservação**. Curitiba, Editora UFPR, 238p.
- Costa, W.J. E. M., P. F. Amorim & J. L. O. Mattos. 2012. Species delimitation in annual killifishes from the Brazilian Caatinga, the *Hypsolebias flavicaudatus* complex (Cyprinodontiformes: Rivulidae): implications for taxonomy and conservation. **Systematics and Biodiversity**, 10(1): 71-91.
- Costa-Silva, G. J., M. S. Rodriguez, F. F. Roxo, F. Foresti & C. Oliveira. 2015. Using Different Methods to Access the Difficult Task of Delimiting Species in a Complex Neotropical Hyperdiverse Group. **PLoS ONE**, 10(9): e0135075. doi:10.1371/journal.pone.0135075.
- Cox, A. J. & P. D. N. Hebert. 2001. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. **Molecular Ecology**, 10: 371-386.
- Coyne, J. A., H. A. Orr & D. J. Futuyma. 1988. Do We Need a New Species Concept? **Systematic Zoology**, 37(2): 190-200.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. **Current Ornithology**, 1: 159-187.
- Cracraft, J. 2002. The seven great questions of systematic biology: an essential foundation for conservation and the sustainable use of biodiversity. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 89: 121-144.
- Crandall, K. A., O. R. P. Bininda-Emonds, G. M. Mace & R. K. Wayne. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. **Trends in Ecology and Evolution**, 15: 290-295.
- Cunha, H. A. C. & Solé-Cava, A. M. 2012. Análise Filogeográfica. *In*: Matioli, S. R. & Fernandes, F. M. C. (Eds). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto, Holos Editora/Sociedade Brasileira de Genética. cap. 21, p. 197-215.
- Dagosta, F. C. P., M. M. F. Marinho & P. Camelier. 2014. A new species of Hyphessobrycon Durbin (Characiformes: Characidae) from the middle rio São Francisco and upper and middle rio Tocantins basins, with comments on its biogeographic history. **Neotropical Ichthyology**, 12: 365-373.

- Davidson, R., P. Vachaspat, S. Mirarab & T. Warnow. 2015. Phylogenomic species tree estimation in the presence of incomplete lineage sorting and horizontal gene transfer. **BMC Genomics**, doi: 10.1186/1471-2164-16-S10-S1.
- D'Amato, M. E., M. M. Esterhuysen, B. C. W. van der Waal, D. Brink & F. A. M. Volckaert. 2007. Hybridization and phylogeography of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* in southern Africa evidenced by mitochondrial and microsatellite DNA genotyping. **Conservation Genetics**, 8: 475-488.
- D'Horta, F. M., G. S. Cabanne, D. Meyer & C. M. Miyaki. 2011. The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. **Molecular Ecology**, 20: 1923-1935.
- de Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. *In*: Howard D. J. & S. H. Berlocher (Eds.). **Endless forms: Species and speciation**. New York, Oxford University Press, cap. 5, p. 57-75.
- de Queiroz, K. 2007. Species Concepts and Species Delimitation. **Systematics Biology**, 56(6): 879-886.
- Degnan, J. H. & N. A. Rosenberg. 2006. Discordance of Species Trees with Their Most Likely Gene Trees. **PLoS Genetics**, 5(2): 762-768.
- Degnan, J. H. & N. A. Rosenberg. 2009. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. **Trends in Ecology & Evolution**, 24: 332-340.
- Domínguez-Domínguez, O. & Vázquez-Domínguez, E. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. **Animal Biodiversity and Conservation**, 32(1): 59-70.
- Drummond, A. J. & A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, 7: 214.
- Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro & O. Pybus. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology and Evolution**, 22: 1185-1192.
- Drummond, A. J., M. A. Suchar, D. Xie & A. Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, 29: 1969-1973.
- Edwards, S. V., L. Liu & D. K. Pearl. 2007. High-resolution species trees without concatenation. **PNAS**, 104(14): 5936-5941.
- Edwards, S. V. & P. Beerli. 2000. Perspective: Gene Divergence, Population Divergence, and the Variance in Coalescence Time in Phylogeographic Studies. **Evolution**, 54(6): 1839-1854.

- Egger, B., S. Koblmüller, C. Sturmbauer & K. M. Sefc. 2007. Nuclear and mitochondrial data reveal different evolutionary processes in the Lake Tanganyika cichlid genus *Tropheus*. **BMC Evolutionary Biology**, 137: 1-14.
- Eizirik, E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Revista Brasileira de Genética**, 19(4): 23-29.
- Excoffier, L., P. & H. E. 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(3): 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.
- Fink, W. L. & S. H. Weitzman. 1974. The so-called cheirodontin fishes of Central America with description of two new species (Pisces, Characidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 172: 1-46.
- Fontaneto, D., E. Herniou, C. Boschetti, M. Caprioli, G. Melone, C. Ricci & T. G. Barraclough. 2007. Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. **PLoS Biology**, 5:e87. PMID: 17373857.
- Fouquet, A., A. Gilles, A. Vences, C. Marty, M. Blanc & N. J. Gemmel. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. **PLoS ONE**, 2(10): e1109. doi:10.1371/journal.pone.0001109.
- Franco-Magalhães, A. O. B., P. C. Hackspacher & A. R. Saad. 2010. Exumação tectônica e reativação de paleolineamentos no Arco de Ponta Grossa: termocronologia por traços de fissão em apatitas. **Revista Brasileira de Geociências**, 40(2): 184-195.
- Fricke, R. & Eschmeyer, W. N. 2016. **Guide to fish collections**. Disponível em <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/collections.asp>. Acesso em 02 abr. 2016.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, 147: 915-925.
- 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(5): 707-724.
- Funk, D. L. & K. E. Omland. 2003. Species level paraphyly and polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 34: 397-423.

- Forest, F. 2009. Calibrating the Tree of Life: fossils, molecules and evolutionary timescales. **Annals of Botany**, 104: 789-794.
- Gadagkar, S. R., A. S. Rosenberg & S. Kumar. 2005. Inferring Species Phylogenies From Multiple Genes: Concatenated Sequence Tree Versus Consensus Gene Tree. **Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)**, 304B: 64-74.
- Grant, W. S. & B. W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of Heredity**, 89: 415-426.
- Grazziotin, F. G., M. Monzel, S. Echeverrigaray & S. L. Bonatto. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, 15: 3969-3982.
- Godinho, R., B. Mendonça, E. G. Crespo & N. Ferrand. 2006. Genealogy of the nuclear b-fibrinogen locus in a highly structured lizard species: comparison with mtDNA and evidence for intragenic recombination in the hybrid zone. **Heredity**, 96: 454-63.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, 165: 131-137.
- Hardy, M. E., Grady, J. M. & Routman, E. J. 2002. Intraspecific phylogeography of the slender madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlands of United States. **Molecular Ecology**, 11: 2393-2403.
- Hausdorf, B., H. Wilkens & U. Stecker. 2011. Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 60: 89-97.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society**, 270: 313-322.
- Heled, J. & A. J. Drummond. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. **Molecular Biology and Evolution**, 27(3): 570-580.
- Heller, R., L. Chikhi, H. R. Siegmund. 2013. The Confounding Effect of Population Structure on Bayesian Skyline Plot Inferences of Demographic History. **PLoS ONE**, 8(5): e62992. doi:10.1371/journal.pone.0062992.
- Hey, J. & C. A. Machado. 2003. The study of structured populations — new hope for a difficult and divided science. **Nature Reviews Genetics**, 4(7): 535-543.
- Hickerson, M. J., B. C. Carstens, J. Cavender-Bares, K. A. Crandall, C. H. Graham, J. B. Johnson, L. Rissler, P. F. Victoriano & A. D. Yoder. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after. **Molecular Phylogeny and Evolution**, 54: 291-301.

- Hirschmann, A., L. R. Malabarba, A. T. Thomaz & N. J. R. Fagundes. 2015. Riverine habitat specificity constrains dispersion in a Neotropical fish (Characidae) along Southern Brazilian drainages. **Zoologica Scripta**, 44(4): 374-382.
- Ho, S. Y. W. & B. Shapiro. 2011. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. **Molecular Ecology Resources**, 11: 423-434.
- Hubert, N., F. Duponchelle, J. N. C. Garcia-Davila, D. Paugy & J. F. Renno. 2007. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, 16: 2115-2136.
- Hubert, N., R. Hanner, E. Holm, N. E. Mandrak, E. Taylor, M. BurrIDGE, D. Watkinson, P. A. Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April, L. Bernatchez. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **PLoS ONE**, 3: e2490.
- Huxley, J. S. 1938. Clines: an auxiliary taxonomic principle. **Nature**, 142\*(3857): 219-220.
- Ingenito, L. F. S., L. F. Duboc, V. Abilhoa. 2004. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, 7(1): 23-36.
- Leite, Y. L. R., L. P. Costa, A. C. Loss, R. G. Rocha, H. Batalha-Filho, A. C. Bastos, V. S. Quaresma, V. Fagundes, R. Paresque, M. Passamani & R. Pardini. 2016. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. **PNAS**, 113(4):1008-1013.
- Javonillo, R., L. R. Malabarba, S. H. Weitzman & J. R. Burns. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54:498-511.
- Kekkonen, M. & P. D. N. Hebert. 2014. DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows. **Molecular ecology resources**, 14: 706-15.
- Koblmüller, S., B. Egger, C. Sturmbauer & K. M. Sefc. 2010. Rapid radiation, ancient incomplete lineage sorting and ancient hybridization in the endemic Lake Tanganyika cichlid tribe Tropheini. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 55: 318-334.
- Kubatko, L. S. & J. H. Degnan. 2007. Inconsistency of Phylogenetic Estimates from Concatenated Data under Coalescence. **Systematic Biology**, 56(1): 17-24.
- Langeani, F., R. M. C. Castro, O. T. Oyakawa, O. A. Shibatta, C. S. Pavanelli & L. Cassati. 2007. Diversidade da ictiofauna do Alto rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, 7(3): 181-197.
- Lavinia, P. D., P. Escalante, N. C. García, A. S. Barreira, N. Trujillo-Arias, P. L. Tubaro, K. Naoki, C. Y. Miyaki, F. R. Santos & D. A. Lijtmaer. 2015. Continental-scale analysis reveals

- deep diversification within the polytypic Red-crowned ant tanager (*Habia rubica*, cardinalidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 89: 182-193.
- Lewis-Oritt, N., C. A. Porter & R. J. Baker. 2001. Molecular systematics of the family Moormopidae (Chiroptera) based on Cytochrome b and Recombination activator gene 2 sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 20: 426-36.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25: 145-1452.
- Lima, F. C. T. & A. C. Ribeiro. 2011. Continental-Scale Tectonic Controls of Biogeography and Ecology. *In*: Albert, J. S. & R. E. Reis (Eds.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley, University of California Press, cap. 9, p. 145-184.
- Lima, S. M. Q., A. V. Vasconcellos, W. M. Berbel-Filho, C. Lazoski, C. A. M. Russo, I. Sazima & A. M. Solé-Cava. 2016. Effects of Pleistocene climatic and geomorphological changes on the population structure of the restricted-range catfish *Trichogenes longipinnis* (Siluriformes: Trichomycteridae). **Systematics and Biodiversity**, 14(2): 1-16.
- Lima, R. A. F., D. P. Mori, G. Pitta, M. O. Melito, C. Bello, L. F. Magnago, V. P. Zwiener, D. D. Saraiva, M. C. M. Marques, A. A. de Oliveira & P. I. Prado. 2015. How much do we know about the endangered Atlantic Forest? Reviewing nearly 70 years of information on tree community surveys. **Biodiversity and Conservation**, 24: 2135-2148.
- Lupchinski-Jr, E., L. Vargas, R. P. Ribeiro, H., L. M. Moreira, M. Valemtim & J. A. Povh. 2006. A importância da utilização da técnica RAPD para a identificação de dactilogirídeos em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, 9(1): 49-57.
- Mace, G. M. 2004. The role of taxonomy in species conservation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, 359: 711-719.
- Malabarba, L. R., P. C. Neto, V. A. Bertaco, T. P. Carvalho, J. F. dos Santos & L. G. S. Artioli. 2013. **Guia de identificação dos peixes da bacia do rio Tramandaí**. Porto Alegre, Ed. Via Sapiens, 143p.
- Malabarba, L. R. & E. A. Isaia. 1992. The fresh water fish fauna of the rio Tramandaí drainage, Rio Grande do Sul, Brazil, with a discussion of its historical origin. **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS. Série Zoologia**, 5(12): 197-223.
- Maldonado-Coelho, M. 2012. Climatic oscillations shape the phylogeographical structure of Atlantic Forest fire-eye antbirds (Aves: Thamnophilidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, 105: 900-924.

- Mallet, J. 2007. Species, concepts of. *In*: Levin, S. et al. (Eds.) **Encyclopedia of Biodiversity**. Massachusetts, Academic Press, pp. 427-440.
- Marceniuk, A. P., A. W. S. Hilsdorf & F. Langeani. 2011. A ictiofauna de cabeceiras do rio Tietê, São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, 11(3): 217-236.
- Marques, D., F. Santos & S. Silva S. 2013. Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. **Neotropical Ichthyology**, 11: 459-466.
- Martins, F. M. & Domingues, M. V. 2011. Filogeografia. *In*: Carvalho, C. J. B. & E. A. B. Almeida. **Biogeografia da América do Sul: padrões e processos**. São Paulo, Roca, cap. 8, p. 137-150.
- Martins, F. M., A. R. Templeton, A. C. O. Pavan, B. C. Kohlbach & J. S. Morgante. 2009. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology**, 9: 294. doi:10.1186/1471-2148-9-294.
- Martins, F. M., C. Gifalli-Iughetti, C. P. Koiffman & E. E. Harris. 2011. Coalescent analysis of mtDNA indicates Pleistocene divergence among three species of howler monkey (*Alouatta* spp.) and population subdivision within the Atlantic Coastal Forest species, *A. guariba*. **Primates**, 52: 77-87.
- Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. *In*: Claridge, M. F., H. A. Dawah & M. R. Wilson (Eds.). **Species: the units of Biodiversity**. London, Chapman & Hall, cap. 19, p. 381-424.
- Mayr, E. 1957. Species concepts and definitions. *In*: Mayr, E. (Ed.). **The Species problem**. Washington, American Association for the Advancement Science, p. 1-22.
- Mazeti, C. M., T. C. Maniglia, S. M. A. P. Prioli & A. J. Prioli. 2012. Molecular variants in populations of *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characiformes, Characidae) in the upper Paraná river basin. **Acta Scientiarum**, 35(2): 241-248.
- McCormack, J. E., J. Heled, K. S. Delaney, A. T. Peterson & L. Knowles. 2010. Calibrating divergence times on species trees versus gene trees: implications for speciation history of *Aphelocoma* Jays. **Evolution**, 65: 184-202.
- McCormack, J. E., B. C. Faircloth, N. G. Crawford, P. A. Gowaty, R. T. Brumfield & T. C. Glenn. 2012. Ultraconserved elements are novel phylogenomic markers that resolve placental mammal phylogeny when combined with species-tree analysis. **Genome Research**, 22: 746-754.

- McKay, B. D. & R. M. Zink. 2010. The causes of mitochondrial DNA gene tree paraphyly in birds. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54: 647-650.
- Melo, B. F., L. E. Ochoa, R. P. Vari & C. Oliveira. 2016. Cryptic species in the Neotropical fish genus *Curimatopsis* (Teleostei, Characiformes). **Zoologica Scripta**, doi:10.1111/zsc.12178.
- Melo, B. F., R. C. Benine, T. C. Mariguela & C. Oliveira. 2011. A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá, northern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 9: 49-56.
- Melo, M. S. 2002. Canyon do Guartelá, PR: profunda garganta fluvial com notáveis exposições de arenitos devonianos. In: Schobbenhaus, C., D. A. Campos, E. T. Queiroz, M. Winge & M. L. C. Berbert-Born (Eds.). **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil**. Brasília. Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), pp. 279-288.
- Menezes, N. A. 1972. Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das grandes bacias fluviais do Brasil. In: **Poluição e Piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e Instituto de Pesca, pp. 73-108.
- Menezes, N. A. 1988. Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America. In: Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R. (Eds.). **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências.
- Menezes, N. A. & S. H. Weitzman. 1990. Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the glandulocaudin fishes of Brazil and Paraguay. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, 103(2): 380-426.
- Menezes, N. A. & S. H. Weitzman. 2009. Systematics of the Neotropical fish subfamily Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, 7(3): 295-370.
- Menezes, N. A., A. C. Ribeiro, S. H. Weitzman & R. A. Torres. 2008. Biogeography of the Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. **Zootaxa**, 1726: 33-48.
- Menezes, N. A., S. H. Weitzman, O. T. Oyakawa, F. C. T. de Lima, R. M. C. Castro & M. J. Weitzman. 2007. **Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar de espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais**. São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 408p.

- Miller, M. A., W. Pfeiffer & T. Schwartz. 2010. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. *In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, 1-8.
- Mirande, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes) from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8(3): 385-568.
- Moran, P. & I. Kornfield. 1993. Retention of an Ancestral Polymorphism in the Mbuna Species Flock (Teleostei: Cichlidae) of Lake Malawi. *Molecular Biology and Evolution*, 10(5): 1015-1029.
- Morando, M., L. J. Avila, J. Baker & J. W. S. Jr. 2004. Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution*, 58(4): 842-861.
- Moore, W. S. 1995. Inferring Phylogenies from mtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees. *Evolution*, 49(4): 718-726.
- Myers N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. Fonseca & J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858.
- Naidoo, T., M. C. Schoeman, S. M. Goodman, P. J. Taylor & J. M. Lamb. 2015. Discordance between mitochondrial and nuclear genetic structure in the bat *Chaerephon pumilus* (Chiroptera: Molossidae) from southern Africa. *Mammalian Biology*, 81: 115-122.
- Neigel, J. E. & J. C. Avise. 1986. Phylogenetic relationship of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. *In: Nevo, E. & Karlins, S. (Eds). Evolutionary processes and theory*. New York, Academic Press, pp. 515-534.
- Nelson, K. 1964a. Behavior and morphology in the Glandulocaudine fishes (Ostariophysi, Characidae). *University of California Publications in Zoology*, 75(2): 59-152.
- Nelson, K. 1964b. The temporal patterning of courtship behavior in the Glandulocaudine fishes (Ostariophysi, Characidae). *Behavior*, 14(1-2): 90-146.
- Nevado, B., S. Koblmüller, C. Sturmbauer, J. Snoeks, J. Usano-Alemy & E. Verheyen. 2009. Complete mitochondrial DNA replacement in a Lake Tanganyika cichlid fish. *Molecular Ecology*, 18: 4240-4255.
- Nevo, E., 2001. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 6233-6240.
- Nylander, J. A. A. 2004. *MrModeltest v2*. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

- Nyingi, D. W. & J. F. Agnèse. 2007. Recent introgressive hybridization revealed by exclusive mtDNA transfer from *Oreochromis leucostictus* (Trewavas, 1933) to *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in Lake Baringo, Kenya. **Journal of Fish Biology**, 70: 148-154.
- Oliveira-Filho, A. T. & M. A. L. Fontes. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, 32: 793-810.
- Oliveira, C., G. S. Avelino, K. T. Abe, T. C. Mariguela, R. C. Benine, G. Ortí, R. P. Vari & R. M. Corrêa e Castro. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysii: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, 2011: 1-25.
- Oliver O. M., M. Adams, M. S. Y. Lee, M. N. Hutchinson & P. Doughty. 2009. Cryptic diversity in vertebrates: molecular data double estimates of species diversity in a radiation of Australian lizards (*Diplodactylus*, Gekkota). **Proceedings of the Royal Society of London B**, 276: 2001-2007.
- Oyakawa, O. T. & G. M. T. Mattox, 2009. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysii: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. **Neotropical Ichthyology**, 7(2):117-140.
- Pabijan, M., A. Crottini, D. Reckwell, I. Irisarri, J. S. Hauswaldt & M. Vences. 2012. A multigene species tree for Western Mediterranean painted frogs (*Discoglossus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 64: 690-696.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *In*: Hillis D, C. Moritz & B. Mable (Eds.). **Molecular Systematics**. Massachusetts, Sinauer Associates Inc., cap.7, 205-247.
- Pellegrino, K. C. M., M. T. Rodrigues, A. N. Waite, M. Morando, Y. Y. Yassuda & J. W. S. Jr. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, 85: 13-26.
- Pereira, L. H. G., R. Hanner, F. Foresti & C. Oliveira. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetic**, 14: 20.
- Pereira, L. H. G., G. M. G. Maia, R. Hanner, F. Foresti & C. Oliveira. 2011. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. **Mitochondrial DNA**, 22(S1): 71-79.
- Pereira, T. L., U. Santos, C. E. Schaefer, G. O. Souza, S. R. Paiva, L. R. Malabarba, E. E. Schmidt & J. A. Dergam. 2012. Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)

- (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. **Journal of Biogeography**, 1-10.
- Peters, J. L., Y. Zhuravlev, I. Fefelov, A. Logie & K. E. Omland. 2007. Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between gadwall and falcated duck (*Anas* spp.). **Evolution**, 161: 1992-2006.
- Piggott, M. P., N. L. Chao & L. B. Beheregaray. 2011. Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. **Biological Journal of the Linnean Society**, 102: 391-403.
- Pinheiro, F., F. de Barros, C. Palma-Silva, M. F. Fay, C. Lexer & S. Cozzolino. 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**, 38: 1923-1935.
- Pinho, C., D. J. Harris & N. Ferrand. 2008. Non-equilibrium estimates of gene flow inferred from nuclear genealogies suggest that Iberian and North African wall lizards (*Podarcis* spp.) are an assemblage of incipient species. **BMC Evolutionary Biology**, 8: 63 doi:10.1186/1471-2148-8-63.
- Pons, J., T. G. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D. P. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W. D. Sumlin & A. P. Vogler. 2006. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. **Systematic Biology**, 55(4): 595-609.
- R Development Core Team. 2009. **Writing R Extensions**. Manual included with R version 2.10.0.
- R Development Core Team. 2013. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**.
- Ramos-Onsins, S. E. & J. Rosas. 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. **Molecular Biology and Evolution**, 19: 2092-2100.
- Rambaut, A. 2009. **FigTree, version 1.3.1**. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em 10 dez. 2015.
- Rambaut, A. & A. J. Drummond. 2009. **Tracer, version 1.5**. Disponível em: [http://beast.bio.ed.ac.uk/Main\\_Page](http://beast.bio.ed.ac.uk/Main_Page). Acesso em 16 dez. 2015.
- Rato, C., D. J. Harris, S. Carranza, L. Machado & A. Perera. 2015. The taxonomy of the *Tarentola mauritanica* species complex (Gekkota: Phyllodactylidae): Bayesian species delimitation supports six candidate species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 94: 271-278.

- 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**, 196: 1-11.
- Renno, J. F., N. Hubert, J. P. Torrico, F. Duponchelle, J. Nunez Rodriguez, C. Garcia Davila, S. C. Willis & E. Desmarais. 2006. Phylogeography of *Cichla* (Cichlidae) in the upper Madera basin (Bolivian Amazon). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 41: 503-510.
- Ribeiro, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, 4(2): 225-246.
- Ribeiro, M. C., J. P. Metzger, A. C. Martensen, F. J. Ponzoni & M. M. Hirota. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, 142: 1141-1153.
- Ribeiro, A. C., R. M. Jacob, R. S. R. Silva, F. C. T. Lima, D. C. Ferreira, K. M. Ferreira, T. C. Mariguela, L. H. G. Pereira & C. Oliveira. 2013. Distributions and phylogeographic data of rheophilic freshwater fishes provide evidences on the geographic extension of a central-Brazilian Amazonian palaeoplateau in the area of the present day Pantanal Wetland. **Neotropical Ichthyology**, 11: 319-326.
- Ribeiro, R. A., J. P. Lemos-Filho, A. C. S. Ramos & M. B. Lovato. 2011. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, 106: 46-57.
- Riddle, B. R., Dawson, M. N., Hadly, M. N. E., Hafner, D. J., Hickerson, M. J., Mantooh, S. J. & Yoder, A. D. 2008. The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. **Progress in Physical Geography**, 32: 173-202.
- Rokas, A., B. L. Williamns, N. King & S. B. Carroll. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. **Nature**, 425: 798-80.
- Ross, J. L. S. 2002. A Morfogênese da bacia do Ribeira de Iguape e os sistemas ambientais. **GEOUSP – Espaço e Tempo**, 12: 1-16.
- Roxo, F. F., L. E. Ochoa, G. J. Costa-Silva & C. Oliveira. 2015. Species delimitation in *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) using morphologic and genetic approaches. **DNA Barcodes**, 3: 110-117.
- Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends in Ecology & Evolution**, 1: 9-10.
- Saadi, A., M. N. Machette, K. M. Haller, R. L. Dart, L. Brandley & A. M. P. D. Souza. 2002. Map and Database of Quaternary Faults and Lineaments in Brazil. A project of the

- International Lithosphere Program Task Group II-2, Major Active Faults of the World. Disponível em <http://pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-230/>. Acesso em 30 mar. 2016.
- Sant'Anna, J. F., M.C. de Almeida, M. R. Vicari, O. A. Schibatta & R. F. Artoni. 2006. Levantamento rápido de peixes em uma lagoa marginal do rio Imbituva na bacia do alto rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, 12(1): 39-46.
- Santos, U., C. M. Völcker, F. A. Belei, M. B. Cioffi, L. A. C. Bertollo, S. R. Paiva & J. A. Dergam. 2009. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, 75: 2326-2343.
- Sarmiento-Soares, L. & R. Martins-Pinheiro. 2010. A fauna de peixes da bacia do Reis Magos e microbacias de Serra, Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, 28: 205-141.
- Sarmiento-Soares, L. & R. Martins-Pinheiro. 2014. A fauna de peixes nas bacias do sul do Espírito Santo, Brasil. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, 13: 13-37.
- Shaw, K. L. 2002. Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: What mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. **PNAS**, 99(5): 16122-16125.
- Silva, G. S. C., B. F. Melo, C. Oliveira & R. C. Benine. 2013. Morphological and molecular evidence for two new species of *Tetragonopterus* (Characiformes: Characidae) from central Brazil. **Journal of Fish Biology**, 82: 1613-1631.
- Sivasundar, A., E Bermingham & G. Ortí. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, 10: 407-417.
- Sites, J. W. & J. C. Marshall. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. **Trends in Ecology and Evolution**, 18(9): 462-470.
- Sota, T. & A. P. Vogler. 2001. Incongruence of Mitochondrial and Nuclear Gene Trees in the Carabid Beetles *Ohomopterus*. **Systematic Biology**, 50(1): 39-59.
- Spellman, G. M. & J. Klicka. 2006. Testing hypotheses of Pleistocene population history using coalescent simulations: phylogeography of the pygmy nuthatch (*Sitta pygmaea*). **Proceedings of the Royal Society of London B**, 273: 3057-3063.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, doi:10.1093/bioinformatics/btu033.
- Stephens, M., N. Smith & P. Donnelly. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetics**, 68: 978-989.

- Strecker, U., L. Bernachez & H. Wilkens. 2003. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). **Molecular Ecology**, 12: 699-710.
- Strecker, U., V. H. Faúndez & H. Wilkens. 2004. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 33: 469-481.
- Sullivan, J. P., J. G. Lundberg & M. Hardman. 2006. A phylogentic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using RAG-1 and RAG-2 nuclear sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 41: 636-662.
- Tagliacollo, V. A., M. J. Bernt, J. M. Craig, C. Oliveira & J. S. Albert. 2016. Model-based total evidence phylogeny of Neotropical electric knifefishes (Teleostei, Gymnotiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 23-59.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, 123: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123: 585-595.
- Takahashi, K., Y. Terai, M. Nishida & N. Okada. 2001. Phylogenetic Relationships and Ancient Incomplete Lineage Sorting Among Cichlid Fishes in Lake Tanganyika as Revealed by Analysis of the Insertion of Retroposons. **Molecular Biology and Evolution**, 18(11): 2057-2066.
- Talavera, G., V. Dincă & R. Vila. 2013. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. **Methods in Ecology and Evolution**, 4: 1101-1110.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28(10): 2731-2739.
- Taylor, W. R. & G. C. Van Dyke. 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium**, 9: 107-109.
- Thomaz, A. T., L. R. Malabarba, S. L. Bonatto & L. L. Knowles. 2015a. Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, 1-13.
- Thomaz, A. T., D. Arcila, G. Ortí & L. R. Malabarba. 2015b. Molecular phylogeny of the subfamily Stevardiinae Gill, 1858 (Characiformes: Characidae): classification and the evolution of reproductive traits. **BMC Evolutionary Biology**, 15: 1-25.

- Thomé, M. T., Zamudio, K. R., Giovanelli, J. G. R., Haddad, C. F. B., Baldissera, F. A. & Alexandrino, J. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 55: 1018-1031
- Thomé, M. T., Zamudio, K. R., Haddad, C. F. B & Alexandrino, J. 2014. Barriers, rather than refugia, underlie the origin of diversity in toads endemic to the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, 23(24): 6152-6164..
- Ting, N., A. J. Tosi, Y. Li, Y-P. Zhang & T. R. Disotell. 2008. Phylogenetic incongruence between nuclear and mitochondrial markers in the Asian colobines and the evolution of the langurs and leaf monkeys. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 46: 466-474.
- Toews, D. P. L & A. Brelsford. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. **Molecular Ecology**, 21: 3907-3930.
- Toffoli, D., T. Hrbek, M. L. G. de Araújo, M. P. de Almeida, P. Charvet-Almeida & I. P. Farias. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). **Genetics and Molecular Biology**, 31: 324-336.
- Tonini, J. F. R., L. P. Costa & A. C. Carnaval. 2013. Phylogeographic structure is strong in the Atlantic Forest; predictive power of correlative paleodistribution models, not always. **Journal Zoological Systematics and Evolutionary Research**, 51: 114-121.
- Torres, R. & J. Ribeiro. 2009. The remarkable species complex *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Glandulocaudinae) from the Southern Atlantic Rain forest (Brazil) as revealed by molecular systematic and population genetic analyses. **Hydrobiologia**, 617: 157-170.
- Turchetto-Zolet, A. C., F. Pinheiro, F. Salgueiro & C. Palma-Silva. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, 22: 1193-1213.
- Turner, T. F., M. V. McPhee, P. Campbell & K. O. Winemiller. 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. **Journal of Fish Biology**, 64: 186-201.
- Valdez-Moreno M., N. V. Ivanova, M. Elías-Gutiérrez, S. Contreras-Balderas, P. D. N. Hebert. 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. **Journal of Fish Biology**, 74: 377-402.
- Vanzolini P. E. & E. E. Williams. 1981. The vanishing refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 34: 251-255.

- Vari, R. P. 1988. The Curimatidae, a Lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes): distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. *In: Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R. (Eds.). Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns.* Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 343-377.
- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. *In: Eguiarte, L., Souza, V. & Aguirre, X. (Eds.). La ecología molecular de plantas y animales.* México, INE. cap. 14, p. 441-466.
- Vergara, J., M. M. Azpelicueta & G. Garcia. 2008. Phylogeography of the Neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la Plata basin, South America, and conservation remarks. *Neotropical Ichthyology*, 6(1): 75-85.
- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last & P. D. N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1847-1857.
- Ward, R. D., R. Hanner & P. D. N. Hebert. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74, 329-356.
- Wares, J. P. & C. W. Cunningham. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 12: 2455-2469.
- Waters, J. M., Rowe, D. L., Apte, S., King, T. M., Wallis, G. P., Anderson, L., Norris, R. J., Craw, D. & Burrige, C. P. 2007. Geological dates and molecular rates: rapid divergence of rivers and their biotas. *Systematic Biology*, 56: 271-28.
- Weitzman, S. H. & M. J. Weitzman. 1982. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. *In: Prance, G. T. (Ed.). Biological diversification in the Tropics.* New York, Columbia University Press, p. 403-422.
- Weitzman, S. H., N. A. Menezes & M. J. Weitzman. 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. *In: Vanzolini, P. E. & W. R. Heyer (Eds.). Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns.* Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, p. 379-427.
- Wilkinson, M. J., L. G. Marshall & J. G. Lundberg. 2006. River behavior on megafans and potential influences on diversification and distribution of aquatic organisms. *Journal of South American Earth Sciences*, 21: 151-172.

- Xia, X. & P. Lemey. 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. *In: Lemey, P., M. Salemi, Vandamme, A. M. **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny***. Cambridge, University Press, p.615-630.
- Xia, X., Z. Xie, M. Salemi, L. Chen & Y. Wang. 2003. An index of substitution saturation and its application. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 26: 1-7.
- Zink, R. M. & G. F. Barrowclough. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. ***Molecular Ecology***, 17: 2107-2121.

## 8. Apêndice A

**Tabela 1.** Lista das espécies e espécimes de Glandulocaudini utilizadas nas análises moleculares e seus respectivos números de *vouchers* e tecido, localidades e marcadores sequenciados. Espécimes em negrito também tiveram o gene nuclear RAG2 sequenciado. Em relação a *Mimagoniates microlepis*, os indivíduos estão separados por haplogrupo, sendo apresentados no sentido norte-sul de distribuição. Para as abreviações institucionais, ver o item ‘Material & Métodos’.

Espécie	Voucher	Tecido	Bacia	Localidade	Sequências	
					COI	16S rRNA
<b>HAPLOGRUPO 1</b>						
<b><i>Mimagoniates microlepis</i></b>	MZUSP 112663	<b>LBP 70049</b>	Costeira	Riacho afluente do rio Pardo – Canavieiras (BA)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70050			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70032	Costeira	Riacho afluente da bacia do rio Peruípe – Alcobaça (BA)	✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70033			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70034			-	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70035			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70036			✓	-	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70037			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70038			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70039			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70040			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70041			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70042	Costeira	Riacho afluente da bacia do rio Itaúnas – Itaúnas (ES)	✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70043			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70044			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70045			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70046			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70047			✓	✓	
<b><i>Mimagoniates microlepis</i></b>	<b>LBP 70048</b>			✓	✓	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 11102			UFRGS 931F	Costeira	Riacho sem nome – São Mateus (ES)
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 931G	✓	✓		
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 931H	✓	✓		
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 931I	✓	✓		
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 931J	✓	✓		

HAPLOGRUPO 2

<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 10756	LBP 49795	Paraíba do Sul	Riocho sem nome – Bom Jardim (RJ)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 49796			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 49797			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 49798			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 49799			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	MZUSP 118711	Topótipo 7	Costeira	Rio Macacu – Cachoeiras de Macacu (RJ)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		Topótipo 8			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		Topótipo 11			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		Topótipo 13			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	MZUSP 115095	LBP 70083	Paraíba do Sul	Rio Paquequer – Teresópolis (RJ)	✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70084			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70085			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70086			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70087			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70088			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70089			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70090			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70091			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70092			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 3867	LBP 22431	Costeira	Riocho afluente do rio da Fazenda – Ubatuba (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 22432			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 22433			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 22434			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 14407	LBP 60535	Costeira	Riocho sem nome – Ubatuba (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 60536			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 60537			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 60538			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 7887	LBP 60539	Costeira	Rio Indaiá – Ubatuba (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 37043			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 37044			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 37045			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 37046			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 3550	LBP 37047	Costeira	Riocho sem nome – Ubatuba (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 21167			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 21168			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 21169			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 14386	LBP 21170	Costeira	Rio Escuro – Ubatuba (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 21171			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 54842			✓	✓

<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 14380	LBP 54815	Costeira	Riacho sem nome – Caraguatatuba (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 54816			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 54817			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 54818			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 54819			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 14373	LBP 54401	Costeira	Riacho sem nome – Caraguatatuba (SP)	✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 54405			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 14362	LBP 54764	Costeira	Riacho sem nome – Caraguatatuba (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 54765			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 54766			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 54767			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 54768			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 1433	LBP 53353	Costeira	Barra do Una – São Sebastião (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53354			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53355			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53356			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53357			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	MZUSP 115096	LBP 70093	Costeira	Riacho sem nome – São Sebastião (SP)	-	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70094			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70095			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70096			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70097			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70098			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70099			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 14325	LBP 53331	Costeira	Riacho condomínio Morada da Praia – Bertioga (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53332			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53333			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53334			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 14315	LBP 53297	Costeira	Afluente do rio Itaguapé – Bertioga (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53298			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53299			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53300			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53301			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	MZUSP 115098	LBP 70100	Costeira	Riacho sem nome – Bertioga (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70101			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70102			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70103			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70104			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70105			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70106			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70107			-	✓

<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70108			-	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70109			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 14306	LBP 53268	Costeira	Riacho sem nome – Bertioga (SP)	✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53269			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53270			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53271			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 53272			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 1240	LBP 1145	Costeira	Riacho afluente do rio Preto – São Vicente (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 1146			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 1148			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 8171	LBP 38124	Costeira	Rio Mongaguá – Mongaguá (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 38125			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 38126			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 38127			✓	✓
<b><i>Mimagoniates microlepis</i></b>	LBP 6817	LBP 33039	Costeira	Riacho afluente do rio Preto – Itanhaém (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 33040			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 33041			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 33042			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 12431	UFRGS 816A	Costeira	Riacho Cachoeira da Anta – Peruíbe (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 816B			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 816C			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 816D			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 816E			✓	✓

**HAPOGRUPO 3**

<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 8732	LBP 40276	Alto Tietê/Paraná	Rio Itaquaxiara, afluente do Embu-Mirim – Itapecerica da Serra (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 40277			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 40278			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 40279			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>	MZUSP 115093	LBP 70068	Alto Tietê/Paraná	Rio Itaquaxiara, afluente do Embu-Mirim – Itapecerica da Serra (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70069			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70070			✓	✓
<b><i>Mimagoniates microlepis</i></b>		LBP 70071			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70072			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70073			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 70074			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70075	✓	✓			
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70076	✓	✓			
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 70077	✓	✓			
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 1260	LBP 11201			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 11202			-	✓

<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 2872	LBP 18586	Ribeira de Iguape	Rio Fau – Miracatu (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 18587			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 18588			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 18589			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 18590			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 7545	LBP 36024	Ribeira de Iguape	Riacho afluente do rio Mumuna – Iguape (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 36025			✓	✓
<b><i>Mimagoniates microlepis</i></b>		<b>LBP 36092</b>			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 36093			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 7419	LBP 35687	Ribeira de Iguape	Rio Pindauba – Jacupiranga (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 35688			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 35689			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 35690			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 35691			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	MZUEL 8450-2		Costeira	Rio Utinga – Guaraqueçaba (PR)	✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 14698	UFRGS 757B	Costeira	Rio Tagaçaba – Tagaçaba (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 757C			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 757D			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 757E			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 14678	UFRGS 720A	Costeira	Rio Lageado – Antonina (PR)	-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 720B			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 720C			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 720D			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 769	LBP 8488	Ribeira	Rio Capivari, afluente do Ribeira de Iguape, em Bocaiuva do Sul PR	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 8489			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 8490			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 8491			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 7170	LBP 34355	Costeira	Rio Marumbi, afluente do Nhundiaquara – Morretes (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 34356			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 34357			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 34358			✓	✓
<b><i>Mimagoniates microlepis</i></b>		<b>LBP 34359</b>			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 2076	LBP 14414	Costeira	Rio Nhundiaquara – Morretes (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 14415			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 14416			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 3661	LBP 21735	Costeira	Rio Passa Sete – Morretes (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 7161	LBP 34327	Costeira	Riacho sem nome da Baía de Paranaguá – Morretes (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 34328			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 34503			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 34504			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 34505			✓	✓

<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 759	LBP 8466	Costeira	Riacho costeiro da Baía de Paranaguá – Morretes (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 8467			✓	✓
<b>HAPLOGRUPO 4</b>						
<i>Mimagoniates microlepis</i>	<b>LBP 13208</b>	LBP 55225	Iguaçu/Paraná	Rio Piraquara – Curitiba (PR)	-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 55226			-	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 55227			✓	-
<b><i>Mimagoniates microlepis</i></b>		<b>LBP 55228</b>			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 55229			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 1046	LBP 9106	Iguaçu/Paraná	Rio dos Patos – Lapa (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 1204	LBP 10582	Iguaçu/Paraná	Rio dos Patos – Lapa (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 10621			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 751	LBP 8423	Costeira	Riacho sem nome – Pontal do Paraná (PR)	✓	✓
		LBP 8425				
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 2069	LBP 14391	Costeira	Rio Colônia Preta – Paranaguá (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 14392			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 14393			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 14394			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	<b>LBP 7150</b>	LBP 34284	Costeira	Riacho Km 25 Matinhos/Paranaguá – Matinhos (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 34285			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 34286			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 34287			✓	✓
<b><i>Mimagoniates microlepis</i></b>		<b>LBP 34288</b>			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 2058	LBP 34289	Costeira	Riacho Descoberto – Guaratuba (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 14346			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 14347			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 14348			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 14349			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 744	LBP 14350	Costeira	Rio São João – Guaratuba (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 8414			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 8416			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 13878			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 13879			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 2024	LBP 13880	Costeira	Rio Garuva – Garuva (SC)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 13881			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		LBP 13882			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 3654	LBP 21717	Costeira	Rio Garuva – Garuva (SC)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 12862	UFRGS 1572A	Tibagi/Paraná	Rio Tibagi – Ponta Grossa (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 1572B			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 1572C			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 1572D			✓	✓

<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 1572E			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	MZUSP 115638	ex 1	Tibagi/Paraná	Rio Guarauninha – Palmeira (PR)	✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		ex 2			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		ex 3			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 12868			UFRGS 1578	Iguaçu/Paraná
<i>Mimagoniates microlepis</i>	MZUSP 115039	ex 1	Costeira	Rio Acaraí – São Francisco do Sul (SC)	✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		ex. 3			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 1584A			Iguaçu/Paraná	Rio Negro – Itaiópolis (SC)
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 1584B	✓	✓			
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 1584C	✓	✓			
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 1584D	✓	✓			
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 1584E	✓	✓			
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 740	LBP 8293	Costeira	Ribeirão Cavallo – Jaraguá do Sul (SC)	✓	✓
<b><i>Mimagoniates microlepis</i></b>	<b>LBP 3639</b>	<b>LBP 21685</b>	Costeira	Ribeirão Cavallo – Jaraguá do Sul (SC)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 16315	UFRGS 2758A	Costeira	Rio Mampituba – Praia Grande (SC)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 2758B			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 16313	UFRGS 2756B	Costeira	Rio Mampituba – Morro Azul (RS)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 2756C			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 2756D			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 2756E			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 2756F			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 12596	UFRGS 1296A	Costeira	Rio Mampituba – Três Cachoeiras (RS)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 1296B			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 1296C			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 1296D			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 1296E			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 16520	UFRGS 2848	Costeira	Rio Três Forquilhas – Itati (RS)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 17994	UFRGS 3667A	Costeira	Rio Tramandaí – Maquiné (RS)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 3667B			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 3667C			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 3667D			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 3667E			✓	-
<i>Mimagoniates microlepis</i>	UFRGS 18474	UFRGS 3867A	Costeira	Rio Maquiné – Maquiné (RS)	✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 3867B			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 3867C			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 3867D			✓	✓
<i>Mimagoniates microlepis</i>		UFRGS 3867E			✓	-
<i>Mimagoniates inequalis</i>	LBP 3383	LBP 21275	Costeira	Arroio dos Corrientes – Pelotas (RS)	✓	✓
<i>Mimagoniates inequalis</i>		LBP 21276			-	✓
<i>Mimagoniates inequalis</i>		LBP 21277			✓	✓
<i>Mimagoniates inequalis</i>		LBP 21278			✓	✓

<i>Mimagoniates lateralis</i>	LBP 8212	LBP 38201	Costeira	Riacho sem nome – Mongaguá (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>		LBP 38431			✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>	LBP 70078		Costeira	Riacho sem nome – Itanhaém (SP)	✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>	LBP 70079				✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>	LBP 70080				✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>	LBP 70081				✓	-
<b><i>Mimagoniates lateralis</i></b>	<b>LBP 70082</b>				✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>	LBP 7147	LBP 34274	Costeira	Riacho sem nome – Guaratuba (PR)	✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>		LBP 34275			✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>		LBP 34276			✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>		LBP 34277			✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>		LBP 34278			✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>	LBP 11450	LBP 52281	Costeira	Riacho sem nome – Itapoá (SC)	✓	-
<i>Mimagoniates lateralis</i>		LBP 52282			✓	-
<b><i>Mimagoniates lateralis</i></b>		<b>LBP 52283</b>			✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>		LBP 52284			✓	✓
<i>Mimagoniates lateralis</i>		LBP 52285			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	MZUSP 115092	LBP 70119	Costeira	Rio Marcanai, bacia do rio Real – Jandaíra (BA)	-	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	MZUSP 112691	LBP 70018	Costeira	Rio Patipe – Valença (BA)	✓	✓
<b><i>Mimagoniates sylvicola</i></b>		<b>LBP 70019</b>			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70020			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70021			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70022			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70023			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70024			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70025			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70026			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70027			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	MZUSP 112657	LBP 70051	Costeira	Córrego afluente do rio Pardo – Canavieiras (BA)	✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70052			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70053			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70054			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70055			-	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70056			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70057			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	MZUSP 112679	LBP 70028	Costeira	Córrego Grande, afluente do rio Pardo – Canavieiras (BA)	✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70029			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70030			-	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>		LBP 70031			✓	✓
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70003				✓	✓

<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70004	Costeira	Riacho entre Barra do Cahy e Ponta do Corumbau – Prado (BA)	✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70005			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70006			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70007			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70008			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70009			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70010			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70011			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70012			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70013			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70014			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70015			✓	✓	
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	LBP 70016			✓	✓	
<b><i>Mimagoniates sylvicola</i></b>	<b>LBP 70017</b>			✓	✓	
<i>Mimagoniates rheocharis</i>	MCP 28770			Costeira	Lagoa Garopaba – Garopaba (SC)	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>	UFRGS 12640	Costeira	Rio Araranguá – Nova Veneza (SC)	UFRGS 1375A	✓	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 1375B	✓	-
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 1375C	✓	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 1375D	✓	-
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 1375E	✓	-
<i>Mimagoniates rheocharis</i>	UFRGS 12896	Costeira	Rio Araranguá – Timbé do Sul (SC)	UFRGS 911A	✓	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 911B	✓	-
<b><i>Mimagoniates rheocharis</i></b>				<b>UFRGS 911C</b>	✓	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 911D	✓	-
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 911E	✓	-
<i>Mimagoniates rheocharis</i>	UFRGS 16561	Costeira	Rio Mampituba – Praia Grande (SC)	UFRGS 2893A	✓	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 2893B	✓	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 2893C	✓	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 2893D	✓	-
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 2893E	✓	-
<i>Mimagoniates rheocharis</i>	UFRGS 12588	Costeira	Rio Tramandaí – Itati (RS)	UFRGS 1264A	✓	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 1264B	✓	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 1264C	✓	✓
<i>Mimagoniates rheocharis</i>				UFRGS 1264D	✓	-
<i>Mimagoniates rheocharis</i>	UFRGS 17968	UFRGS 3641	Costeira	Rio Tramandaí – Maquiné (RS)	✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>	MZUSP 115244-2	Costeira	Rio Guaratuba – Salesópolis/Bertioga (SP)	✓	✓	
<i>Glandulocauda melanopleura</i>	MZUSP 115244-4			✓	✓	
<i>Glandulocauda melanopleura</i>	MZUSP 115244-5			✓	✓	
<i>Glandulocauda melanopleura</i>	LBP 4507			LBP 24537	✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>				<b>LBP 24538</b>	✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>				LBP 24539	✓	✓

<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 24540	Alto Tietê/Paraná	Rio Paranapiacaba – Santo André (SP)	✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 24541			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 24542			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 24553			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>	MZUSP 111017	LBP 70058	Costeira	Rio Capivari, afluente do rio Branco, bacia do rio Itanhaém – Itanhaém (SP)	✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 70059			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 70060			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 70061			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 70062			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 70063			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 70064			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 70065			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 70066			✓	✓
<i>Glandulocauda melanopleura</i>		LBP 70067			✓	✓
<i>Glandulocauda caerulea</i>	MZUSP 117479-2		Iguaçu/Paraná	Ribeirão Amola Faca – Balsa Nova (PR)	✓	✓
<i>Glandulocauda caerulea</i>	MZUSP 117479-3				✓	✓
<i>Glandulocauda caerulea</i>	MZUSP 117479-4				✓	✓
<i>Glandulocauda caerulea</i>	MZUSP 117479-5				✓	✓
<i>Lophiobrycon weitzmani</i>	LBP 8166	LBP 38090	Grande/Paraná	Rio Claro – Delfinópolis (MG)	✓	✓
<i>Lophiobrycon weitzmani</i>	MNRJ 31626			Ribeirão da Cachoeira – Capitólio (MG)	✓	✓
<i>Lophiobrycon weitzmani</i>	MNRJ 31664			Ribeirão da Capivara – Capitólio (MG)	✓	✓

## 9. Apêndice B

Lista do material examinado durante o presente estudo, organizada por Haplogrupo definido pelas análises moleculares e na sequência: Estado e/ou bacia principal, abreviatura institucional com número de tombo de cada lote, número total de espécimes presente no lote, indicação de material diafanizado/corado (d&c) ou com tecido disponível (mol) quando houver seguido pela amplitude de variação do comprimento padrão dos exemplares (CP).

### Haplogrupo 1

**Bahia:** MNRJ 32213, 21, 15,4-35,5 mm CP; MZUSP 28812, 11, 17,1-26,8 mm CP; MZUSP 28814, 3, 15,4-22,2 mm CP; MZUSP 73399, 26, 1 d&c, 16,2-28,8 mm CP; MZUSP 73400, 5, 16,1-22,3 mm CP; MZUSP 93866, 26, 12,4-35,4 mm CP; MZUSP 93868, 1, 18,2 mm CP; MZUSP 93869, 1, 20,2 mm CP; MZUSP 112651, 2, 1 mol, 22,2-25,7 mm CP; MZUSP 112823, 37, 1 d&c, 15,8-28,2 mm CP; MZUSP 112663, 2 mol, 20,4-20,7 mm CP. **Espírito Santo:** MZUSP 26893, 3, 28,2-31,3 mm CP; MZUSP 26894, 13, 25,3-42,2 mm CP; MZUSP 26898, 17, 20,5-33,0 mm CP; MZUSP 28810, 6, 13,1-18,5 mm CP; MZUSP 51783, 41, 11,1-23,2 mm CP; MZUSP 51785, 2, 28,1-31,0 mm CP; MZUSP 90760, 20, 22,1-30,6 mm CP; MZUSP 112829, 48, 1d&c, 14,1-27,4 mm CP, 62 mol, 11,6-26,6 mm CP; MZUSP 112396, 2, 19,1-20,6 mm CP; MZUSP 117058, 9, 15,3-33,9 mm CP, Espírito Santo; UFRGS 11102, 4, 19,2-22,1 mm CP.

### Haplogrupo 2

**Rio de Janeiro:** LBP 10756, 5, 5 mol, 34,3-51,0 mm CP; MNRJ 29968, 1, 48,1 mm CP; MNRJ 27801, 1, 39,4 mm CP; MNRJ 29973, 8, 14,8-47,7 mm CP; MNRJ 32686, 94, 19,7-48,2 mm CP; MNRJ 38897, 14, 19,9-33,3 mm CP. **São Paulo:** LBP 8171, 1, 30,6 mm CP; LIRP 519, 1, 42,3 mm CP; LIRP 533, 1, não mensurado; LIRP 546, 1, 47,5 mm CP; LIRP 955, 2, 35,5-39,0 mm CP; LIRP 4931, 6, 20,0-32,1 mm CP; LIRP 1076, 15, 29,9-47,7 mm CP; MZUSP 19591, 1, 45,0 mm CP; MZUSP 19820, 2, 38,1-48,9 mm CP; MZUSP 26899, 10, 42,0-61,0 mm CP; MZUSP 26901, 14, 23,9-33,5 mm SL; MZUSP 26906, 8, 29,9 mm-44,1 mm SL; MZUSP 26909, 2, 20,8-29,4 mm CP; MZUSP 27524, 3, 35,7-39,5 mm CP; MZUSP 27532, 12, 23,7-36,8 mm CP; MZUSP 37372, 17, 23,8-47,3 mm CP; MZUSP 39991, 1, 45,7 mm CP; MZUSP 51353, 3, 33,9-38,0 mm CP; MZUSP 51356, 2, 21,3 25,8 mm CP; MZUSP 53401, 1, 33,6 mm CP; MZUSP 53495, 9, 15,7-38,5 mm CP; MZUSP 53352, 6, 21,4-45,3 mm CP; MZUSP 53671, 32, 21,4-33,5 mm CP; MZUSP 53684, 74, 16,4-48,4 mm CP; MZUSP 55290, 112, 21,4-45,7 mm CP; MZUSO 58731, 15, 25,2-39,9 mm CP; MZUSP 72835, 43, 19,6-36,8 mm CP; MZUSP 72838, 9, 30,8-42,7 mm CP; MZUSP 72840, 3, 32,7-40,0 mm CP; MZUSP 78935, 8, 14,3-38,9 mm CP; MZUSP 78942, 89, 18,4-44,7 mm CP; MZUSP 79914, 24, 19,0-38,8 mm CP; MZUSP 79935, 13, 21,3-38,5 mm CP; MZUSP 80328, 6, 28,0-41,0 mm CP; MZUSP 83449, 1, 44,8 mm CP; MZUSP 83450, 1, 42,3 mm CP; MZUSP 84907, 1, 43,4 mm CP; MZUSP 84917, 1, 43,6 mm CP; MZUSP 84941, 3, 17,8-27,6 mm CP; MZUSP 85390, 4, 16,3-29,6 mm CP; MZUSP 87243, 7, 18,2-25,4 mm CP; MZUSP 87603, 20, 19,4-40,5 mm CP; MZUSP 88062, 6, 19,5-29,3 mm CP; MZUSP 97919, 3, 26,1-42,1 mm CP; MZUSP 103969, 21, 18,8-34,5 mm CP; MZUSP 103975, 16, 18,1-28,7 mm CP; MZUSP 103988, 1, 37,6 mm CP; MZUSP 103980, 2, 30,1-30,2 mm CP; MZUSP 113736, 33, 13 mol 24,5-41,8 mm CP; MZUSP 113757, 2, 23,7-25,5 mm CP; MZUSP 114801, 104, 16,2-41,5 mm CP; MZUSP 114813, 26, 17,0-40,4 mm CP; MZUSP 114833, 47, 24,2-46,5 mm CP; MZUSP 114853, 2, 25,3-52,5 mm CP; MZUSP 114893, 3, 18,3-28,4 mm CP; MZUSP 115095, 11, 22,1-33,8 mm CP; MZUSP 115096, 10, 28,4-43,6 mm CP; MZUSP 115097, 69, 11,9-38,4 mm CP; MZUSP 115098, 164,15,4-44,9 mm CP; MZUSP 115118, 494, 18,0-40,7 mm CP; MZUSP 115478, 9, 23,7-44,8 mm CP; UFRGS 12431, 5, 21,6-31,8 mm CP.

### Haplogrupo 3

**São Paulo/Paraná - Ribeira de Iguape:** LBP 769, 48, 5 mol, 28,7-52,4 mm CP; LBP 2872, 10, 18,1-37,3 mm CP; LBP 7419, 5, 25,8-34,8 mm CP; LBP 7545, 32, 17,1-43,6 mm CP; LBP 7456, 3, 25,6-31,1 mm CP; LBP 8732, 7, 20,0-32,1 mm CP; MNRJ 24351, 12, 23,9-54,4 mm CP; MZUSP 408, 1, 40,6 mm CP; MZUSP 20218, 6, 20,6-46,3 mm CP; MZUSP 35284, 5, 25,2-35,0 mm CP; MZUSP 35294, 5, 16,6-46,9 mm CP; MZUSP 36534, 4, 14,7-27,0 mm CP; MZUSP 36556, 13, 18,2-36,8 mm CP, São Paulo; MZUSP 38602, 11, 16,7-35,9 mm CP; MZUSP 38623, 7, 25,2-36,4 mm CP; MZUSP 38641, 3, 26,9-37,5 mm CP; MZUSP 40019, 4, 25,1-37,8 mm CP; MZUSP 40208, 3, 41,5-46,6 mm CP; MZUSP 41851, 3, 14,3-22,0 mm CP; MZUSP 41872, 9, 25,1-32,1 mm CP; MZUSP 42232, 1, 24,9 mm CP; MZUSP 42262, 3, 22,2-29,2 mm CP; MZUSP 42273, 9, 17,1-30,8 mm CP; MZUSP 45195, 8, 18,3-38,4 mm CP;

MZUSP 54905, 1, 44,0 mm CP; MZUSP 55150, 1, 33,5 mm CP; MZUSP 58539, 1, 30,3 mm CP; MZUSP 60135, 1, 35,2 mm CP; MZUSP 62365, 10, 26,7-43,2 mm CP; MZUSP 62400, 1, 17,6 mm CP; MZUSP 66107, 18, 17,0-23,6 mm CP; MZUSP 68270, 1, 26,1 mm CP; MZUSP 68271, 3, 25,0-31,2 mm CP; MZUSP 68272, 3, 20,9-22,7 mm CP; MZUSP 69385, 15,7-27,6 mm CP; MZUSP 69714, 3, 18,2-27,7 mm CP; MZUSP 69722, 2, 13,2-16,7 mm CP; MZUSP 70020, 10, 25,0-44,3 mm CP; MZUSP 70641, 1, 39,5 mm CP; MZUSP 70642, 2, 31,8-40,3 mm CP; MZUSP 78571, 1, 34,4 mm CP; MZUSP 78573, 21, 20,2-43,9 mm CP; MZUSP 78574, 1, 25,9 mm CP; MZUSP 78575, 12, 30,2-41,7 mm CP; MZUSP 79999, 4, 38,2-39,0 mm CP; MZUSP 80000, 18, 24,6-44,1 mm CP; MZUSP 81120, 25, 17,0-27,1 mm CP; MZUSP 82592, 4, 34,3-45,0 mm CP; MZUSP 83009, 9, 19,8-26,8 mm CP; MZUSP 83016, 45, 15,3-34,9 mm CP; MZUSP 84321, 165, 12,1-36,8 mm CP; MZUSP 84325, 1, 16,7 mm CP; MZUSP 84376, 26, 20,5-33,6 mm CP; MZUSP 84617, 4, 21,5-30,5 mm CP; MZUSP 93115, 13, 24,1-43,2 mm CP; MZUSP 100201, 5, 21,1-32,5 mm CP; MZUSP 100213, 23, 25,9-35,3 mm CP. **São Paulo - Alto Tietê:** LBP 8732, 7, 20,0-32,1 mm CP; MZUSP 64314, 1, 30,9 mm CP; MZUSP 88191, 1, 25,7 mm CP; MZUSP 90296, 6, 14,9-35,4 mm CP; MZUSP 108901, 41, 17,2-37,9 mm CP; MZUSP 108902, 4, 21,7-28,3 mm CP; MZUSP 108903, 17, 15,1-29,8 mm CP; MZUSP 108904, 18, 17,4-29,3 mm CP; MZUSP 115093, 26, 2 d&c, 23,4-36,1 mm CP, 15 mol, 23,0-31,2 mm CP. **Paraná:** LBP 759, 4, 3 mol, 29,8-36,7 mm CP; LBP 2076, 3, 3 mol, 27,5-37,5 mm CP; LBP 3661, 1, 1 mol, 35,8 mm CP; LBP 7161, 32, 5 mol, 25,2-36,5 mm CP; LBP 7170, 7, 5 mol, 29,0-37,1 mm CP; LIRP 413, 1, 42,4 mm CP; LIRP 4930, 4, 27,2-34,7 mm CP; MNRJ 32871, 99, 20,1-38,1 mm CP; MNRJ 32921, 52, 19,0-47,2 mm CP; MNRJ 33000, 2, 13,2-42,3 mm CP; MZUEL 8450, 20, 13,9-36,7 mm CP, 1 mol; MZUSP 19870, 6, 33,2-38,6 mm CP; MZUSP 20478, 13, 14,5-35,7 mm CP; MZUSP 20479, 10, 15,5-37,9 mm CP; MZUSP 20487, 8, 21,5-39,4 mm CP; MZUSP 20488, 4, 24,0-29,7 mm CP; MZUSP 20490, 172, 14,6-42,6 mm CP; MZUSP 72839, 17, 22,3-41,9 mm CP; MZUSP 93574, 2, 27,4-34,7 mm CP; MZUSP 117477, 8, 21,4-30,9 mm CP; UFRGS 14678, 4, 4 mol, 26,9-32,2 mm CP; UFRGS 14698, 5, 4 mol, 23,7-28,9 mm CP.

#### Haplogrupo 4

**Paraná/Santa Catarina – Iguçu ou Tibagi:** LBP 1040, 17, 30,2-59,6 mm CP; LBP 1204, 25, 23,2-38,6 mm CP; LBP 13026, 10, 5 mol, 24,9-31,4 mm CP; LBP 13208, 10, 5 mol, 25,1-33,6; LIRP 4932, 5, 14,3-28,7 mm CP; MZUSP 17838, 16, 15,3-24,5 mm CP; MZUSP 40122, 151, 2 d&c, 20-42,4 mm CP; NUP 11685, 4, 36,2-46,1 mm CP; UFRGS 12868, 1, 43,5 mm CP; UFRGS 12878, 2, 28,0-40,0 mm CP; UFRGS 18298, 5, 30,0-35,0 mm CP. **Paraná – Litoral:** LBP 744, 5, 3 mol, 39,2-49,5 mm CP; LBP 3661, 1, 35,8 mm CP; LBP 7150, 150, 15,2-33,5 mm CP; MNRJ 32871, 99, 20,1-38,1 mm CP; MNRJ 32887, 2, 28,3-44,4 mm CP; MNRJ 32921, 52, 19,0-47,2 mm CP; MNRJ 33000, 2, 13,2-42,3 mm CP; MZUSP 20492, 3, 15,4-26,7 mm CP; MZUSP 40288, 62, 13,9-38,4 mm CP; UFRGS 14707, 1, 29,5 mm CP; UFRGS 18304, 5, 32,3-36,8 mm CP. **Santa Catarina – Litoral:** LBP 3639, 1, 26,4 mm CP; LBP 3654, 1, 29,8 mm CP; MZUSP 19871, 9, 18,3-22,4 mm CP; MZUSP 27119, 82, 1d&c, 11,5-44,4 mm CP; MZUSP 28996, 5, 25,7-44,6 mm CP; MZUSP 35512, 3, 38,1-43,1 mm CP; MZUSP 35514, 2, 40,5-48,1 mm CP; MZUSP 35515, 8, 26,6-40,4 mm CP; MZUSP 41789, 15, 1d&c, 27,6-47,5 mm CP; MZUSP 42305, 2, 21,4-28,3 mm CP; MZUSP 61451, 2, 39,7-43,1 mm CP MZUSP 61451, 2, 39,7-43,1 mm CP MZUSP 61451, 2, 39,7-43,1 mm CP; MZUSP 72836, 1, 32,2 mm CP; MZUSP 72845, 3, 30,3-45,4 mm CP; MZUSP 72850, 42, 1d&c, 22,2-40,9 mm CP; MZUSP 72854, 4, 1 d&c, 26,8-48,1 mm CP; MZUSP 72857, 3, 29,5-36,1 mm CP; MZUSP 72858, 10, 29,6-38 mm CP; MZUSP 93571, 27, 19,8-52,5 mm CP; MZUSP 115039, 12, 2d&c, 24,9-47,9 mm CP; UFRGS 12874, 5, 31,1-36,3 mm CP; UFRGS 16315, 1, 28,2 mm CP. **Rio Grande do Sul:** MZUSP 72853, 4, 36 mm CP; UFRGS 12596, 5, 23,2-28,4 mm CP; UFRGS 12607, 3, 24,2-31,7 mm CP; UFRGS 12657, 1, 33,7 mm CP; UFRGS 16313, 4, 19,6-33,5 mm CP; UFRGS 17994, 5, 26,5-29,1 mm CP; UFRGS 18474, 5, 28,7-43,8 mm CP.

# CAPÍTULO 3

=====

Filogeografia, história demográfica e variação morfológica de *Glandulocauda melanopleura* (Ellis) (Characidae: Stevardiinae: Glandulocaudini), espécie endêmica de riachos que drenam a vertente atlântica da Serra do Mar, São Paulo

## Resumo

O gênero *Glandulocauda* inclui as espécies *G. caerulea* e *G. melanopleura*, diagnosticadas, principalmente, por apresentar os raios principais 11 e 12 da nadadeira caudal ligeiramente curvado ventralmente, que representa o estágio inicial de formação de uma glândula produtora de feromônio. As espécies do gênero têm distribuição restrita e são típicas de riachos que drenam áreas de elevada altitude da região de planalto do escudo cristalino brasileiro, em importantes afluentes da bacia do rio Paraná. *Glandulocauda caerulea* é considerada endêmica do alto curso da bacia do rio Iguaçu, nos estados do Paraná e Santa Catarina, enquanto *G. melanopleura* era considerada endêmica das cabeceiras do rio Alto Tietê, no Estado de São Paulo. Recentemente, entretanto, exemplares desta espécie foram coletados no alto curso de bacias costeiras (e.g., rios Itanhaém, Guaratuba), que drenam a vertente atlântica da Serra do Mar. A análise deste material indicou variação morfológica diferente daquela encontrada nos espécimes da localidade tipo, inclusive com sobreposição de alguns caracteres entre estes indivíduos e *G. caerulea*. Entender a variação morfológica detectada nas diferentes populações de *G. melanopleura* e a sua distribuição alopátrica é o principal objetivo do presente trabalho, no qual foi realizado um estudo populacional amplo da espécie, incluindo análises moleculares e morfológicas. Para tanto, foram obtidas e analisadas sequências de dois genes mitocondriais, 16S rRNA e COI, de amostras de *G. melanopleura* de quase toda a distribuição da espécie, incluindo localidade tipo, além de amostras de *G. caerulea* e de outras espécies de Characidae (glandulocaudíneos e não glandulocaudíneos), utilizados como grupo externo. Para as análises morfológicas, foi analisado material de toda a distribuição conhecida de *G. melanopleura*. As análises filogenéticas de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança da matriz mitocondrial concatenada (1059 pb) corroboraram o monofiletismo de *G. melanopleura* e indicaram forte estruturação dentro da espécie, com separação entre as populações do rio Guaratuba daquelas do rio Alto Tietê e Itanhaém, cujos indivíduos foram considerados proximamente relacionados. As análises de identificação molecular de espécies (GMYC e DNA barcoding), baseadas no gene mitocondrial COI (522 pb), indicaram a existência de duas linhagens distintas, uma incluindo indivíduos do (Alto Tietê, Itanhaém) e outra representada pela população de Guaratuba. No entanto, as análises morfológicas realizadas não corroboraram estes resultados, com sobreposição de valores que não justificaria a separação das linhagens em espécies distintas. Por outro lado, estas análises indicaram aumento considerável da amplitude de variação de alguns caracteres merísticos de *G. melanopleura*, que é apresentado e discutido. Os dados de distribuição da espécie, aliados ao tempo de divergência

estimado através da análise relógio molecular entre as diferentes populações analisadas e às informações geomorfológicas disponíveis, indicam que o atual padrão de distribuição da espécie é reflexo de eventos de capturas fluviais relativamente recentes. A ocorrência destes fenômenos entre a bacia do rio Tietê e as bacias costeiras de Guaratuba e Itanhaém é também discutida com base em informações disponíveis na literatura e nos dados obtidos no presente estudo.

## 1. Introdução

O gênero *Glandulocauda* Eigenmann foi criado por Eigenmann (1911) para incluir *G. inequalis* Eigenmann, *G. melanogenys* Eigenmann e *G. melanopleura* Eigenmann, definidas por uma combinação de caracteres morfológicos: dentes do pré-maxilar distribuídos em duas séries distintas, com quatro, raramente cinco, na série interna; nadadeira caudal sem escamas, mas com algumas cobrindo a base dos raios do lobo superior; origem da nadadeira dorsal mais próxima da transversal que passa pela base da nadadeira caudal (extremidade posterior da placa hipural) do que do focinho; segundo “preorbital” (i.e., infraorbital) cobrindo quase toda a região infraorbital (Eigenmann, 1911: 168-170). Anos mais tarde, *G. inequalis* foi alocada no gênero *Mimagoniates* Regan (Géry, 1964; Weitzman & Fink, 1985) e, mais recentemente, Menezes & Weitzman (2009) concluíram que *G. melanogenys* é sinônimo júnior de *Hyphessobrycon melanopleurus* Ellis (1911: 157-158) e propuseram a substituição do nome *melanogenys* Eigenmann por *melanopleura* Ellis. No entanto, esta mudança taxonômica fez da espécie *G. melanopleura* proposta por Eigenmann (1911) homônimo júnior secundário de *G. melanopleura* de Ellis (1911), já que ambas as espécies foram mantidas no mesmo gênero, *Glandulocauda* (Menezes & Weitzman, 2009). Assim, para resolver este impasse, os autores propuseram um novo nome em substituição, *G. caerulea* Menezes & Weitzman para *G. melanopleura* Eigenmann. Assim, atualmente, estão incluídas em *Glandulocauda* duas espécies, *G. caerulea* Menezes & Weitzman e *G. melanopleura* (Ellis) (Menezes & Weitzman, 2009). Ainda segundo estes autores, o gênero é diagnosticado principalmente por apresentar os raios principais 11 e 12 da nadadeira caudal ligeiramente curvado ventralmente, o que foi proposto por eles como sendo o estágio inicial de formação de uma glândula em táxons mais derivados relacionados.

*Glandulocauda melanopleura* foi descrita com base em material coletado nas cabeceiras do rio Tietê (bacia do Paraná), em São Paulo, e foi, durante muito tempo, considerada endêmica desta bacia, ocorrendo na localidade tipo e em áreas adjacentes (e.g., Weitzman,

2003). Anos mais tarde, entretanto, material adicional da espécie foi coletado nas cabeceiras dos rios costeiros de Guaratuba, Itatinga e Ribeira do Iguape (Ribeiro *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2007, 2008; Serra *et al.*, 2007; Menezes & Weitzman, 2009). Em relação à ocorrência de *G. melanopleura* nestas bacias, Menezes & Weitzman (2009) salientam que: (1) os três exemplares coletados em um afluente do rio Ribeira representam o primeiro registro da espécie fora do trecho superior da drenagem do Tietê; (2) os espécimes da bacia do rio Guaratuba apresentam alguns caracteres merísticos com valores um pouco diferenciados daqueles encontrados nos exemplares da localidade tipo e adjacências, mas como há sobreposição e os caracteres morfométricos são muito similares, os autores optaram por considerar as amostras como coespecíficas até que novos exemplares do rio Guaratuba fossem coletados e analisados; e (3) os dois exemplares da bacia do rio Itatinga foram registrados por Serra *et al.* (2007), mas não analisados pelos autores no trabalho em questão. Recentemente, outras populações de *G. melanopleura*, com variações no número de raios da nadadeira anal e em outros caracteres merísticos, foram também encontradas em drenagens não pertencentes à bacia do rio Paraná, onde, até então, não se tinha registro da espécie.

Assim, ao analisarem material de *G. melanopleura* destas “novas localidades”, Menezes & Weitzman (2009) detectaram variação morfológica diferente da encontrada nos espécimes do Alto Tietê e pontuaram, inclusive, a sobreposição de alguns caracteres merísticos entre indivíduos destas populações e *G. caerulea*. Naquela ocasião, no entanto, como os autores não tinham muito material destas localidades em mãos e havia certa sobreposição de caracteres com *G. melanopleura sensu stricto* (holótipo e topótipos), eles optaram por deixar todas as populações sob o nome *G. melanopleura* até que material adicional fosse analisado. Menezes & Weitzman (2009) salientam, portanto, a necessidade de estudos mais detalhados, principalmente em nível populacional para melhor entender a espécie e também a sua história evolutiva, conforme já pontuado por Menezes *et al.* (2008). Assim, a variação morfológica detectada nas diferentes populações de *G. melanopleura*, aliada à distribuição alopátrica da espécie motivaram a realização do presente estudo, que teve como objetivo principal uma análise populacional ampla da espécie, incluindo análises moleculares e morfológicas. O padrão de distribuição de *G. melanopleura* e os possíveis eventos responsáveis pelo estabelecimento deste padrão também são apresentados e discutidos.

## 2. Material & Métodos

### 2.1. Análises moleculares

#### 2.1.1 Amostragem taxonômica

Amostras de tecido (músculo, brânquias e/ou nadadeiras) de *Glandulocauda melanopleura* foram obtidas através de coletas, realizadas nos anos de 2012 e 2015, e de doação do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* de Botucatu. O material coletado durante o presente estudo (tanto *vouchers*, quanto tecido) foi tombado nas coleções ictiológicas do LBP e do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Além do material de *G. melanopleura*, também foram obtidas amostras/seqüências de sete espécies de Glandulocaudini, *Glandulocauda caerulea*, *Lophiobrycon weitzmani* Castro, Ribeiro, Benine & Melo, *Mimagoniates inequalis* (Eigenmann), *M. lateralis* (Nichols), *M. microlepis* (Steindachner), *M. rheocharis* Menezes & Weitzman e *M. sylvicola* Menezes & Weitzman. Esta lista pode ser consultada no ‘Apêndice A’ do Capítulo 2 desta tese. Parte deste material foi coletada durante o presente estudo e outra parte foi obtida através de doações das seguintes instituições, além do LBP: Museu de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ), Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Núcleo de Pesquisa Aplicada em Aquicultura e Pesca do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense de Araquari (NUPA), Universidade Estadual de Maringá/Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Antes das análises moleculares propriamente ditas, os *vouchers* de todas as amostras foram analisados e identificados em nível específico, com base nos caracteres diagnósticos de morfologia externa apresentados na literatura (*e.g.*, Menezes & Weitzman, 2009) e, no caso de *G. melanopleura*, revisados neste trabalho.

Ainda em relação à amostragem taxonômica, é importante ressaltar que, em algumas análises, foram também incluídas seqüências gênicas de espécies de Characidae não pertencentes a Glandulocaudini. As justificativas para estas inclusões e a maneira como estas seqüências foram obtidas serão devidamente esclarecidas quando necessário.

#### 2.1.2. Extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento

Os procedimentos laboratoriais para extração, amplificação e sequenciamento foram os mesmos daqueles apresentados no Capítulo 1 desta tese, onde poderão ser consultados. No presente estudo, foram utilizados dois genes mitocondriais, 16S rRNA e Citocromo Oxidase I (COI). Características gerais sobre estes genes e considerações sobre a utilização deles em estudos filogeográficos são fornecidas nos Capítulos 1 e 2 desta tese, onde poderão ser consultadas.

### **2.1.3. Obtenção das sequências consenso, alinhamentos e matrizes de dados**

As sequências consenso para cada gene foram obtidas e alinhadas seguindo os mesmos procedimentos apresentados no Capítulo 1, onde poderão ser consultados. No presente estudo, foram geradas três matrizes de dados, uma para cada um dos genes individualmente e uma concatenada, onde estes genes foram analisados como um único *locus*. Para a concatenação, só foram incluídos indivíduos que tiveram ambos os genes amplificados e sequenciados. A matriz utilizada para cada uma das análises feita é indicada quando necessário.

### **2.1.4. Análises filogenéticas**

Para testar a monofilia de *Glandulocauda melanopleura*, inferir o grau de estruturação genética e avaliar suas relações de parentesco, foram feitas duas análises de reconstrução filogenética utilizando os métodos probabilísticos de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV). Cada método foi aplicado individualmente nas três matrizes geradas e procedimentos de análise foram os mesmos detalhados no Capítulo 2 desta tese, onde poderão ser consultados.

O grupo interno inclui diferentes populações de *G. melanopleura* ao longo da sua distribuição geográfica (cujas sequências foram obtidas no presente estudo) e o grupo externo é formado por outras sete espécies de Glandulocaudini (*Lophiobrycon weitzmani*, *Glandulocauda caerulea*, *Mimagoniates inequalis*, *M. lateralis*, *M. microlepis*, *M. rheocharis* e *M. sylvicola*), além de três espécies de Characiformes não pertencentes a esta tribo (*Bryconops caudomaculatus* (Günther), *Cheirodon ibicuhiensis* Eigenmann e *Spintherobolus leptoura* Weitzman & Malabarba). Sequências de *B. caudomaculatus* foram utilizadas para o enraizamento das topologias, já que este é o táxon do presente conjunto de dados mais distante de *G. melanopleura*. No caso do grupo externo, a maioria das sequências também foi obtida no presente estudo, com exceção das de *B. caudomaculatus*, *C. ibicuhiensis*, *L. weitzmani* e *S.*

*leptoura*, que foram retiradas do *GenBank*, e correspondem àquelas depositadas por Oliveira *et al.* (2011) e/ou Thomaz *et al.* (2015a).

Antes da análise filogenética, estimou-se para cada gene separadamente o Índice de Saturação de Substituição ( $I_{SS}$ ), como descrito por Xia *et al.* (2003) e Xia & Lemey (2009) e detalhado no Capítulo 1. O melhor modelo de evolução nucleotídica também foi estimado para cada gene individualmente no programa MrModeltest v. 2.2 (Nylander, 2004), sob o critério de informação de Akaike (AIC). As matrizes de dados geradas (16S, COI e concatenada) também foram analisadas no MEGA v. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) para obtenção do número de sítios conservados (C), variáveis (V) e informativos (Pi).

### **2.1.5. Análise de *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC) e *DNA Barcoding***

No presente estudo, a análise de GMYC (Pons *et al.*, 2006; Fontaneto *et al.*, 2007) foi implementada para avaliar se as diferentes populações alopátricas de *Glandulocauda melanopleura* representam ou não uma única linhagem. Os procedimentos metodológicos para realizar esta análise foram os mesmos daqueles apresentados no Capítulo 2, onde deverão ser consultados. O método de *DNA Barcoding* (Hebert *et al.*, 2003) também foi utilizado para testar a existência de mais de uma linhagem sob o nome *G. melanopleura*. Os valores de divergência genética entre as diferentes populações da espécie foram calculados através do programa MEGA sob o modelo Kimura-2 parâmetros (K2P). Para ambas as análises, foi utilizada apenas a matriz de dados do COI.

### **2.1.6. Tempo de divergência**

Para estimar o tempo de divergência entre as populações de *Glandulocauda melanopleura*, foi construída uma árvore datada através da análise de relógio molecular, com calibração fóssil e usando somente a matriz do COI. Nesta matriz, foram incluídas sequências de todas as populações da espécie, além de todos os outros Glandulocaudini e de outras cinco espécies de Characidae, *Asytanax paranae* Eigenmann, *Inpaichthys kerri* Géry & Junk, *Lepidocharax burnsi* Ferreira, Menezes & Quagio-Grassiotto, *L. diamantina* Ferreira, Menezes & Quagio-Grassiotto e *Spintherobolus leptoura*. Sequências destas espécies também foram obtidas no presente estudo, com exceção das de *L. burnsi* e *S. leptoura*, retiradas do *GenBank*, onde foram depositadas por Oliveira *et al.* (2011) e Thomaz *et al.* (2015a), respectivamente. A análise em si foi implementada nos programas do pacote BEAST v. 1.8.0. No BEAUti, foi gerado o arquivo de entrada da análise, sob os seguintes parâmetros: modelo de substituição

HKY+I+G, conforme encontrado por meio do MrModeltest; modelo de relógio *Relaxed Clock Uncorrelated Lognormal*; árvore randômica de partida; e *prior Speciation: Birth-Death Process*. Conforme detalhado no Capítulo 1, a calibração foi feita em 27,5 milhões de anos, datação média mínima estimada para a cladogênese ( $\dagger$ *Megacheiroidon*, *Spintherobolus*), e *S. leptoura* foi indicado no BEAUTi como *stem group*, conforme sugerido por Forest (2009). A análise em si consistiu de duas corridas simultâneas de 100 milhões de gerações cada, com uma árvore salva a cada 10 mil gerações e *burn-in* de 20%. O desempenho e a convergência dos parâmetros entre as corridas foram analisados no programa Tracer v. 1.5.1 (Rambaut & Drummond, 2009), onde também foi checado o desempenho da análise (ESS>200). Depois da remoção do *burn-in*, as corridas independentes foram combinadas no LogCombiner v. 1.8.0, a topologia consenso, com o tempo de divergência entre os clados, foi gerada no TreeAnnotator v. 1.8.0. e, posteriormente, visualizada e editada no FigTree v. 1.3.1 (Rambaut, 2009).

### **2.1.7. Análises filogeográficas**

As análises filogeográficas propriamente ditas foram realizadas com base na matriz concatenada (16S e COI). Todas as matrizes de dados utilizadas no presente estudo estão disponíveis no CD-ROM que acompanha esta tese, onde poderão ser consultadas.

#### **2.1.7.1. Estimativas de estrutura filogeográfica**

As redes de haplótipos foram construídas pelo método de *Median-joining network* (Bandelt *et al.*, 1999) implementado no programa NETWORK v. 5.0.0.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>). O arquivo de entrada deste programa foi gerado no DnaSP v. 5.10 (Librado & Rozas, 2009) a partir da matriz de dados concatenados (16S e COI) já alinhada e contendo apenas sequências de *Glandulocauda melanopleura*. Para verificar o nível de estruturação genética e de variação populacional entre as localidades analisadas, foi implementada a análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992). Neste caso, foram realizadas três análises: (1) considerando população cada uma das localidades independentemente (i.e., rios Alto Tietê, Guaratuba e Itanhaém); (2) considerando como localidades ‘Planalto’ e ‘Costa’ (i.e., Alto Tietê vs. Guaratuba e Itanhaém agrupados); e (3) localidades consideradas de acordo com os resultados das análises filogenéticas (i.e., ‘Alto Tietê e Itanhaém’ vs. ‘Guaratuba’). A significância dos testes foi obtida com mil permutações.

#### **2.1.7.2. Estatísticas sumárias e análises de demografia histórica**

A diversidade nucleotídica por sítio ( $\pi$ ), o número de haplótipos ( $h$ ) e a diversidade haplotípica ( $Hd$ ) foram calculados no DnaSP, tanto para as populações amostradas (localidades) quanto para os haplogrupos. Valores de  $\pi > 0,5\%$  e  $Hd > 0,5$  foram considerados elevados, como sugerido por Grant & Bowen (1988). Para detectar possíveis sinais de expansão demográfica, foram aplicados os testes de neutralidade de Tajimas'D (Tajima, 1989) e  $Fu'F_s$  (Fu, 1997), além do teste de mudança no tamanho da população  $R_2$  (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), também no DnaSP. A significância desses testes foi determinada com base em mil simulações coalescentes.

## 2.2. Análises morfológicas

Nas análises morfológicas, foram realizadas contagens e medidas, de acordo com Fink & Weitzman (1974) e Menezes & Weitzman (1990). Os dados morfométricos são apresentados em tabelas como porcentagens do comprimento padrão (CP), exceto com relação às subunidades da cabeça, apresentadas como porcentagens do comprimento da mesma. Contagens de supraneurais, raios branquiostegais e vértebras foram obtidas a partir de exemplares diafanizados e corados (d&c), preparados de acordo com Taylor & Van Dyke (1975). As vértebras do Aparelho de Weber foram contadas como quatro elementos e o centro caudal composto (PU1+U1) como um elemento único. Quando necessário, o sexo dos espécimes foi confirmado por dissecação. Dados referentes ao material tipo foram extraídos das descrições originais (i.e., Eigenmann, 1911; Ellis, 1911) e de Menezes & Weitzman (2009). Gráficos do tipo *BoxPlot* foram gerados por meio do programa R v. 2.10.0 (R Development Core Team, 2009) com base em alguns caracteres merísticos, para melhor compreensão da variação destes caracteres entre as diferentes populações estudadas. A lista do material examinado na análise morfológica é apresentada no 'Apêndice'. Abreviaturas institucionais são aquelas que constam em Fricke & Eschemeyer (2016).

## 3. Resultados

### 3.1. Análises moleculares

#### 3.1.1. Características das sequências e das matrizes de dados

No presente estudo, foram obtidas sequências parciais de dois genes mitocondriais, 16S rRNA e COI. A matriz do 16S é composta por sequências de 302 indivíduos, sendo 20 pertencentes a *Glandulocauda melanopleura* e 283 às demais espécies, que compõem o grupo externo (três exemplares de *Lophiobrycon weitzmani*, quatro de *Glandulocauda caerulea*, três

de *Mimagoniates inequalis*, 13 de *M. lateralis*, 209 de *M. microlepis*, 12 de *M. rheocharis*, 34 de *M. sylvicola*, além de sequências de um exemplar de *Bryconops caudomaculatus*, dois de *Cheirodon ibicuihensis* e um de *Spintherobolus leptoura*). Na matriz do COI, foram incluídas sequências de 362 indivíduos, sendo 20 pertencentes a *G. melanopleura* e 342 às espécies do grupo externo (três exemplares de *L. weitzmani*, quatro de *G. caerulea*, três de *M. inequalis*, 17 de *M. lateralis*, 255 de *M. microlepis*, 21 de *M. rheocharis*, 35 de *M. sylvicola*, além de sequências de um exemplar de *B. caudomaculatus*, dois de *C. ibicuihensis* e um de *S. leptoura*). Em todos os espécimes de *G. melanopleura* ambos os genes foram amplificados e sequenciados, mas o mesmo não ocorreu no grupo externo, que teve o maior número de sequências do COI. Por outro lado, todos os espécimes do grupo externo, para os quais foram obtidas sequências do 16S, também foram do COI. Assim, já que, para a concatenação, só foram incluídos indivíduos que apresentaram ambos os genes amplificados e sequenciados, a matriz concatenada tem a mesma composição da matriz do 16S (ver Capítulo 2, 'Apêndice A, Tabela 1').

Em nenhuma das matrizes os dados foram considerados saturados, já que os valores dos Índices de Saturação de Substituição ( $I_{SS}$ ) obtidos foram menores que os índices de saturação críticos calculados ( $I_{SS} < I_{SS.C}$ ) de todos os genes. Para cada matriz final gerada, o número de sequências obtidas, seu tamanho (pb) após o alinhamento, número de sítios conservados (C) número de sítios variáveis (V) e número de caracteres informativos (Pi) são apresentados na Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1.** Informações sobre as matrizes de dados geradas no presente estudo.

Informações	Matrizes		
	16S	COI	Concatenada
Número de sequências	302	362	302
Tamanho (pb) após alinhamento	537	522	1059
Sítios conservados (C)	380	323	702
Sítios variáveis (V)	132	199	331
Sítios informativos (Pi)	81	42	245

### 3.1.2. Análise filogenética e tempo de divergência

A conformação geral das árvores e as relações propostas através das análises de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV) da matriz concatenada (1059 pb) são idênticas. Assim, será apresentada apenas a topologia de IB, onde serão indicados, nos

respectivos clados formados, além dos valores de probabilidade posterior, os valores de *bootstrap* da análise de MV. Esta árvore é apresentada na Fig. 1, na íntegra em *Glandulocauda melanopleura*, mas de forma sumarizada no grupo externo.

As topologias obtidas (IB e MV) indicam relativa estruturação genética em *G. melanopleura*, sendo possível distinguir dois clados bem suportados estatisticamente (valores de probabilidade posterior e *bootstrap*  $\geq 0,99$  e 88%, respectivamente). Um deles é formado pelas populações dos rios Alto Tietê (bacia do rio Paraná) e Itanhaém (drenagem costeira) e o outro pelos indivíduos coletados no rio Guaratuba (também drenagem costeira), todos no Estado de São Paulo. Entre os espécimes do Alto Tietê e Itanhaém, não ficou evidenciada, com base nestas análises, nenhuma estruturação clara.

Em todas as análises realizadas, *G. melanopleura* foi recuperada como monofilética. O mesmo, no entanto, não aconteceu em relação ao gênero, uma vez que *G. melanopleura* e *G. caerulea*, sua única congênere, não formaram um clado. Segundo os resultados do presente estudo, *G. melanopleura* está mais relacionada a *Lophobrycon weitzmani*, enquanto *G. caerulea* às espécies de *Mimagoniates* analisadas. Este resultado foi apresentado e discutido com maior profundidade no Capítulo 1 desta tese e esta questão não será abordada novamente aqui, uma vez que o foco do presente estudo é *G. melanopleura*.

De acordo com as datações obtidas a partir da análise de relógio molecular baseada na matriz do gene COI (522 pb) (Fig. 2), a primeira divergência em *G. melanopleura*, que culminou na separação entre o clado (Alto Tietê, Itanhaém) e a população de Guaratuba, ocorreu, muito provavelmente, no começo do Pleistoceno (Quaternário) [média=1,4 m.a.; 95%\_HPD=2,7-0,5 m.a.], podendo ter tido início no final do Plioceno (Neógeno). A divergência entre as populações do Alto Tietê e Itanhaém é mais recente e data do final do Pleistoceno, quase Holoceno [média=0,15 m.a.; 95%\_HPD=0,35-0,04 m.a.].

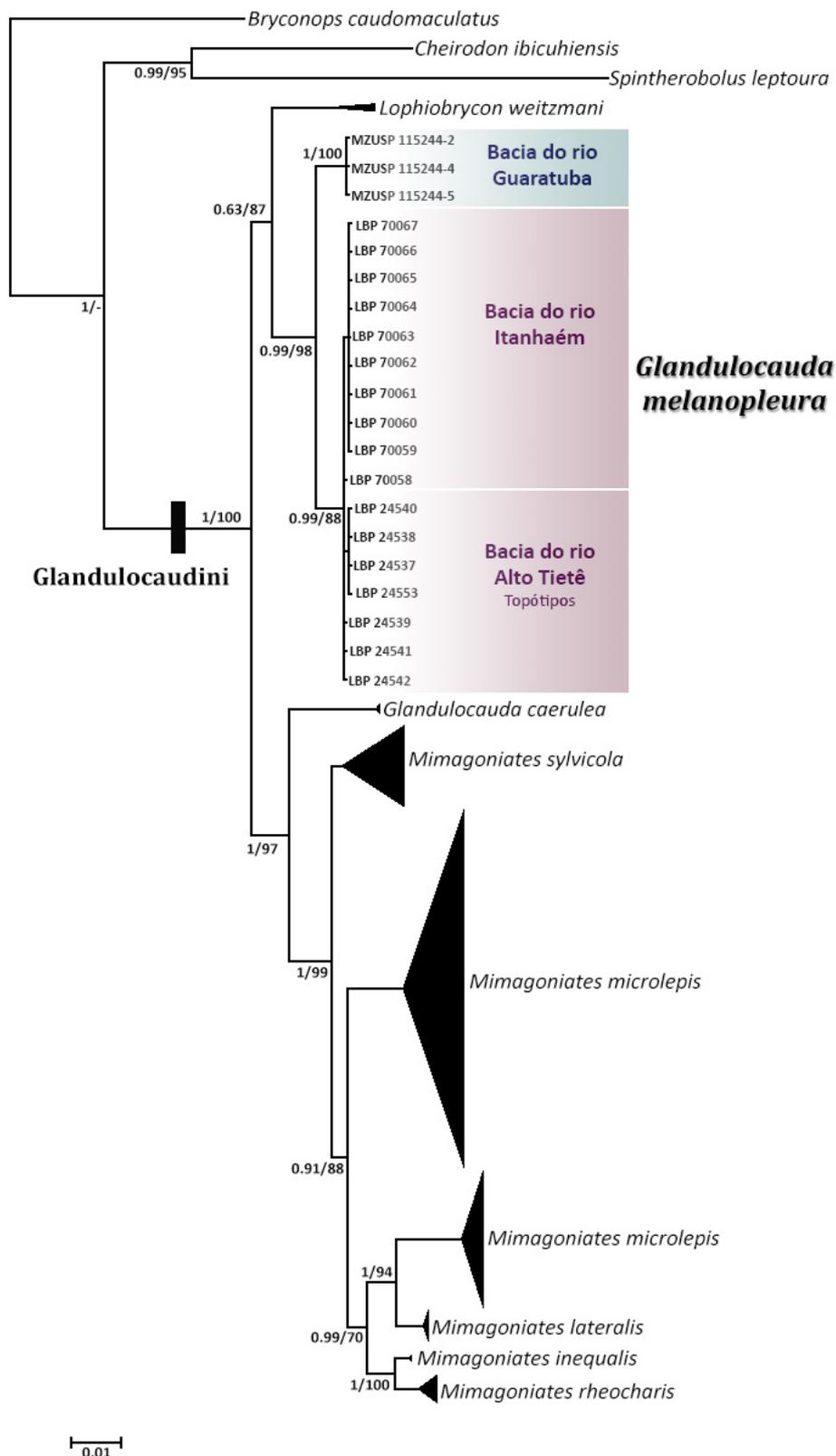
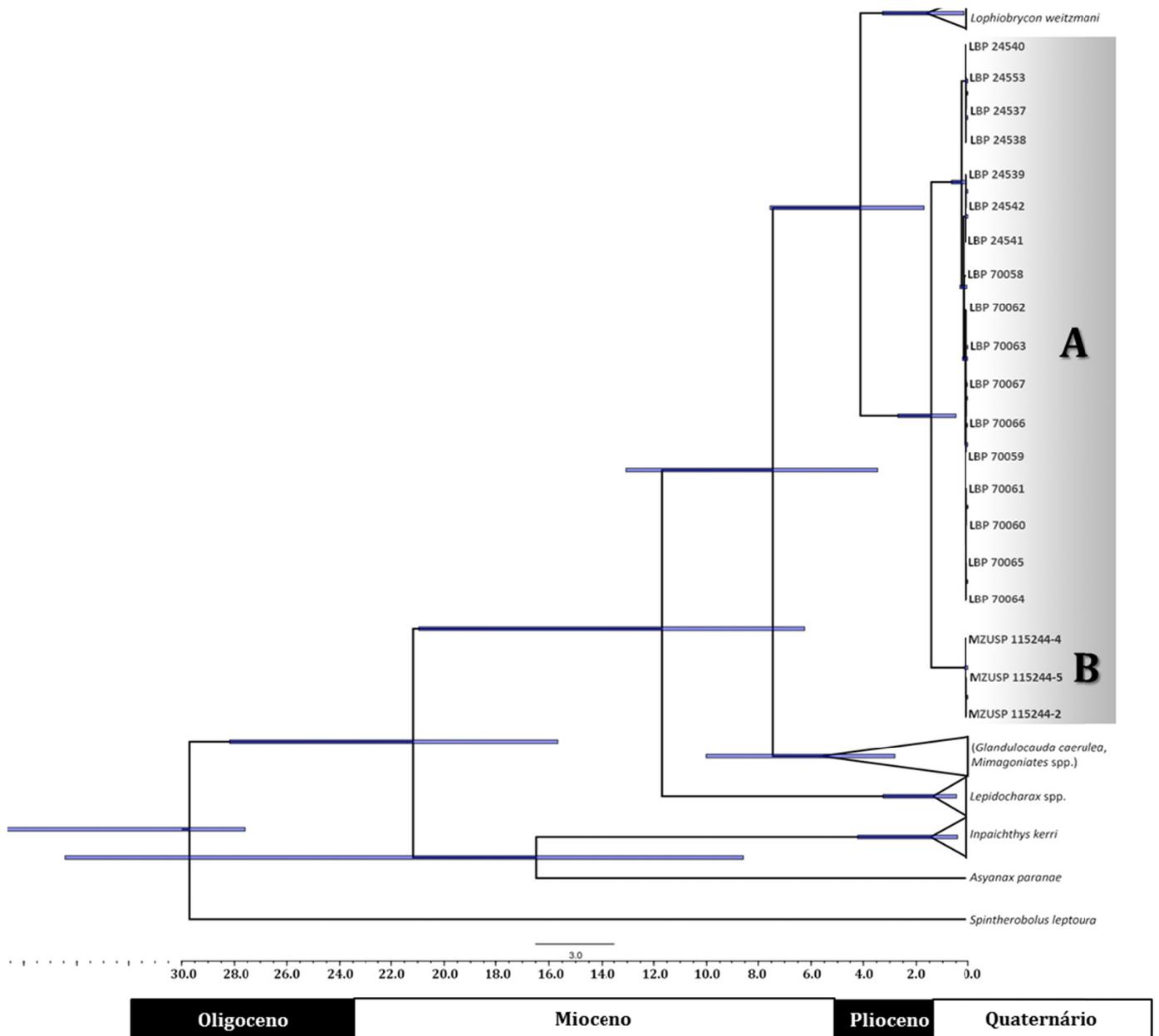


Figura 1. Topologia obtida através da análise de Inferência Bayesiana da matriz de dados mitocondriais concatenada (16S + COI, 1059 pb), mostrando as hipóteses de relação entre as diferentes populações de *Glandulocauda melanopleura* e grupo externo. Os números nos nós indicam os valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (%) respectivamente e o (-) indica que o clado não foi recuperado por meio da análise de Máxima Verossimilhança.



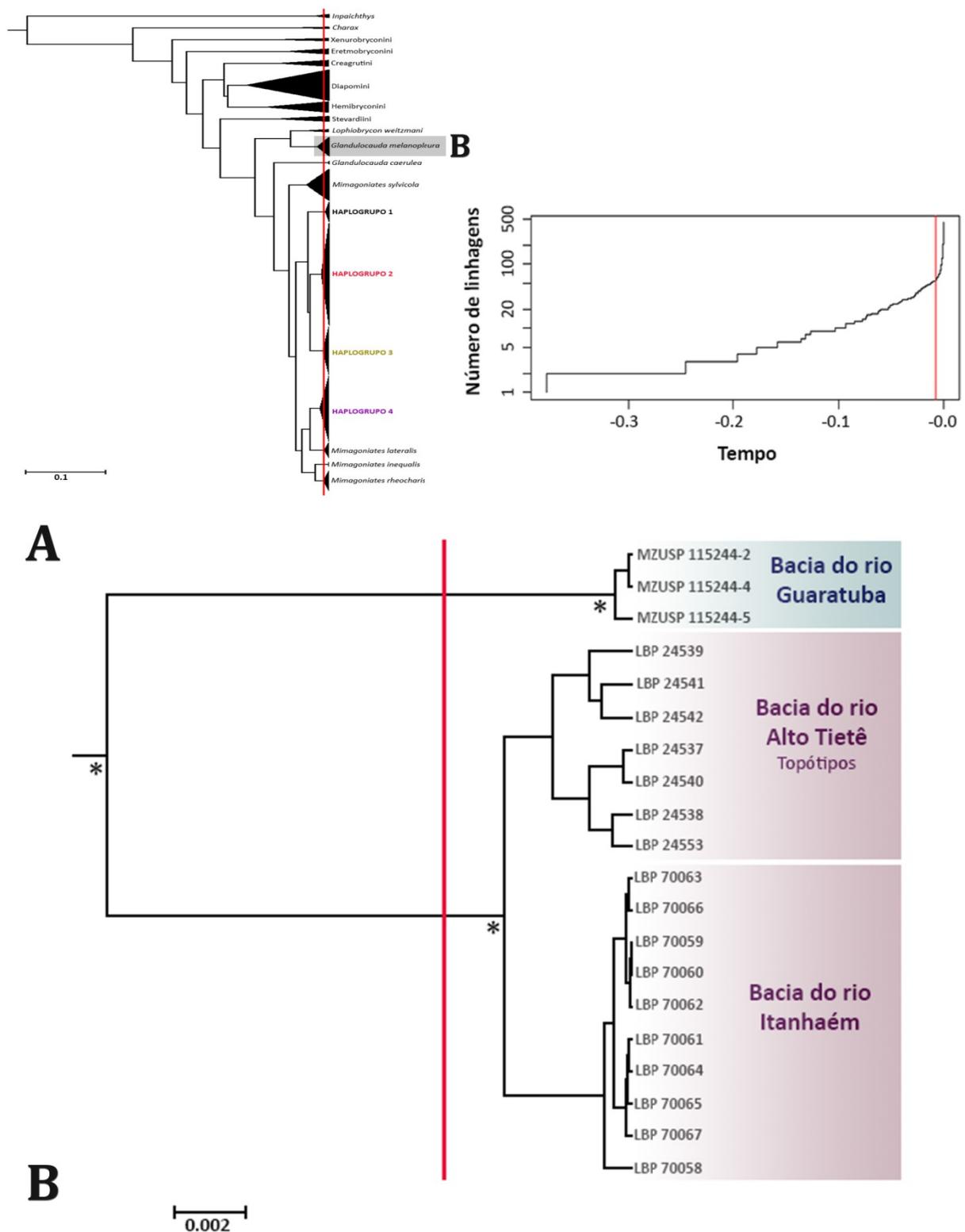
**Figura 2.** Topologia calibrada a partir da análise de relógio molecular baseada na matriz do gene COI (522 pb), indicando as estimativas de datas dos eventos cladogenéticos ocorridos em *Glandulocauda melanopleura* (em destaque). A letra “A” representa o clado (Alto Tietê, Itanhaém) e a letra “B” o clado (Guaratuba). As barras nos nós representam 95% de HPD (*High Posterior Density*) dos tempos de divergência. O eixo X representa milhões de anos (m.a.).

### 3.1.2. Análise de *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC) e *DNA Barcoding*

Na análise de GMYC, o tempo limite (T, i.e., tempo passado desde o presente até a raiz) obtido foi de -0,007639826, indicando que todos os nós antes deste tempo refletem eventos de diversificação e todos aqueles localizados depois refletem eventos coalescentes, a probabilidade do modelo nulo foi 4602,009 e a probabilidade máxima do modelo GMYC foi 4631,357. A fronteira entre divergência inter e intraespecífica é representada, na árvore ultramétrica gerada, pela linha vermelha (Fig. 3), assim, todos os nós antes desta linha (sentido raiz-táxons terminais) indicam eventos de diversificação (espécies) e os nós após a linha indicam eventos coalescentes (populações). Aqui, é importante salientar que a análise de GMYC não tem como objetivo propor relações de parentesco, e sim estabelecer limites de espécies, de maneira que o resultado obtido deve ser interpretado apenas neste sentido. Na análise de GMYC, baseada no gene COI (522 pb), os resultados das análises filogenéticas foram corroborados e os dois clados de *G. melanopleura* foram recuperados como linhagens distintas. Ainda segundo esta análise, os indivíduos do Alto Tietê e Itanhaém representam uma mesma linhagem (Fig. 3). Este resultado foi corroborado pela análise de *DNA Barcoding*, que indicou divergência genética quase nula (0,0003) entre estes indivíduos; a divergência entre as populações do Alto Tietê/Itanhaém e Guaratuba foi de 3% (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de divergência genética (%) entre as três populações de *Glandulocauda melanopleura* (20 exs.) em destaque, *Lophiobrycon weitzmani* (3 exs.), *Glandulocauda caerulea* (4 exs.), *M. microlepis* (255 exs.), *M. sylvicola* (35 exs.), *M. rheocharis* (21 exs.), *M. inequalis* (3 exs.) e *M. lateralis* (17 exs.). Resultados baseados no modelo Kimura-2 parâmetros e na matriz de dados do COI (522 pb).

Espécie/População	Divergência genética (%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Guaratuba</b>									
<b>Alto Tietê</b>	3								
<b>Itanhaém</b>	3	0							
<i>Lophiobrycon weitzmani</i>	8	7	8						
<i>Glandulocauda caerulea</i>	9	11	11	11					
<i>Mimagoniates microlepis</i>	13	12	12	13	11				
<i>Mimagoniates sylvicola</i>	10	10	10	11	8	8			
<i>Mimagoniates inequalis</i>	11	9	10	10	9	7	6		
<i>Mimagoniates rheocharis</i>	11	10	10	11	9	8	6	3	
<i>Mimagoniates lateralis</i>	12	11	11	11	11	7	7	6	6



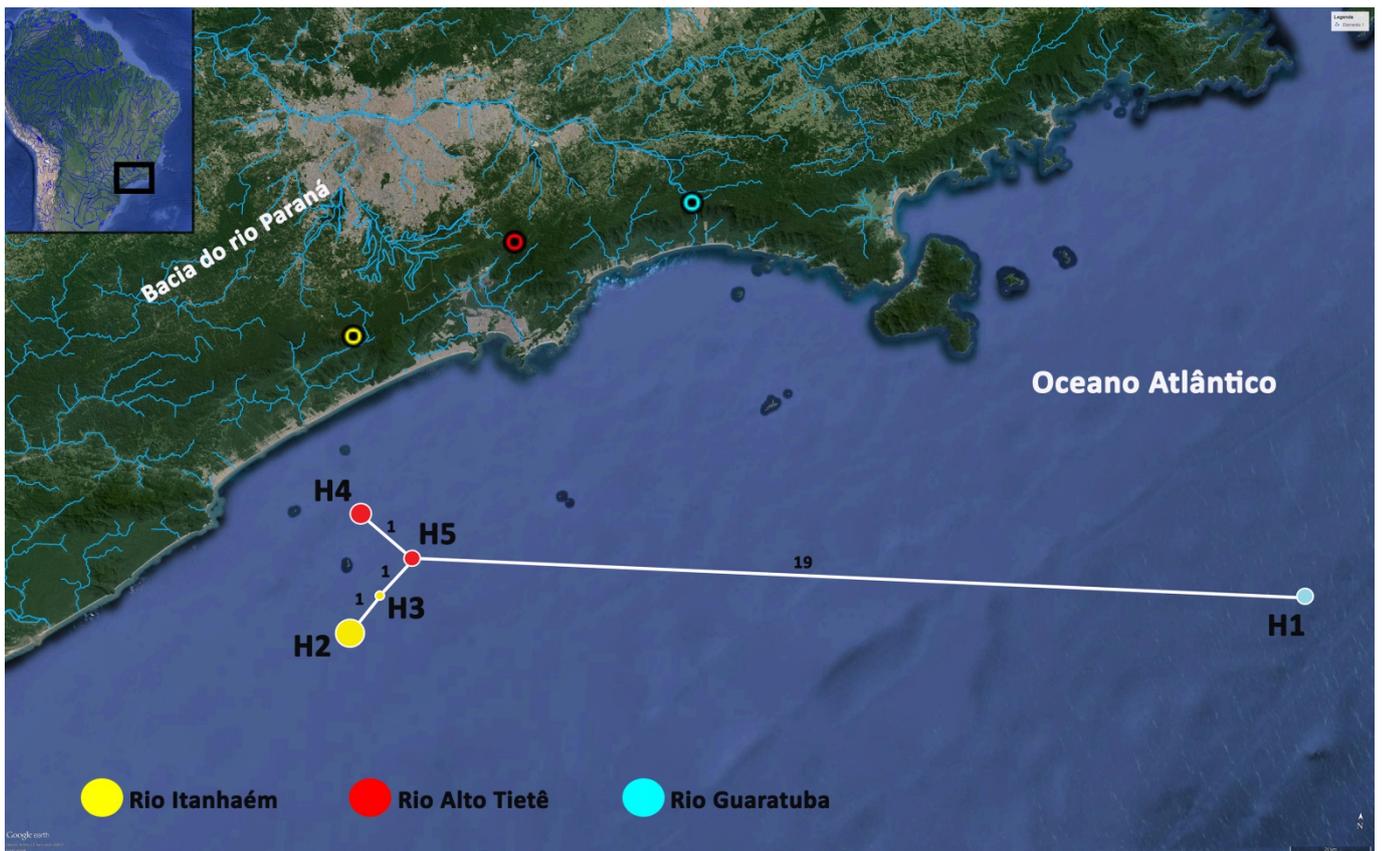
**Figura 3.** (A) Árvore ultramétrica, obtida através do método bayesiano da matriz de dados do gene COI (presente estudo + Thomaz *et al.*, 2015a) e utilizada para análise de GMYC, com destaque para *Glandulocauda melanopleura*. (B) Árvore ultramétrica apresentada em detalhe para as populações de *G. melanopleura*; o asterisco indica probabilidade posterior >0,95. A linha vermelha representa a fronteira entre divergência inter e intraespecífica.

### 3.1.3. Análises filogeográficas

Com relação às análises filogeográficas, foram utilizadas sequências de 20 exemplares de *Glandulocauda melanopleura* de três localidades (= bacias) ao longo de quase toda a distribuição da espécie. Estes pontos incluem a localidade tipo, na bacia do Alto Tietê (bacia do rio Paraná), em Santo André (SP), a bacia costeira de Itanhaém, em Itanhaém (SP) e a bacia costeira do rio Guaratuba, em Bertioga (SP). A ausência de amostras de tecido das bacias dos rios Ribeira de Iguape e Itatinga impediram a inclusão destas populações nas análises moleculares. Como indicado no ‘Material & Métodos’, estas análises foram baseadas na matriz de dados concatenados (16S e COI), que, nesta espécie, possui um total de 1059 pb após alinhamento, 1009 sítios conservados, 22 variáveis e 22 informativos.

#### 3.1.3.1. Estrutura filogeográfica e história demográfica

Na rede de haplótipos dos genes 16S e COI concatenados, a mesma estruturação observada nas análises filogenéticas foi recuperada (Fig. 4), com a separação clara entre a população de *Glandulocauda melanopleura* da bacia do rio Guaratuba daquelas das bacias dos rios Alto Tietê e Itanhaém. Na verdade, a rede indicou estruturação ainda maior, visto que nenhuma das localidades compartilha haplótipos entre si. De acordo com esta análise, nas populações analisadas de *G. melanopleura*, existem cinco haplótipos: H1, que é exclusivo da bacia do rio Guaratuba; H2 e H3, exclusivos de Itanhaém; e H4 e H5, exclusivos do Alto Tietê. O haplótipo central é H5, que difere do H1 por 19 passos mutacionais e do H4 e H3 por apenas um passo mutacional. O H2 se conecta ao haplótipo central (H5) através de H3, de quem se diferencia também por apenas um passo mutacional.



**Figura 4.** Mapa de distribuição e rede de haplótipos de *Glandulocauda melanopleura*, inferida a partir de 1059 pb da matriz concatenada dos genes mitocondriais 16S e COI. Na rede, cada haplótipo é representado por um círculo, cujo tamanho é proporcional à sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos e o valor indicado nelas corresponde ao número de passos mutacionais entre eles.

As estimativas geradas mediante o uso da AMOVA (Tabela 3) também corroboraram as evidências de forte estruturação genética em *G. melanopleura*, em especial quando as localidades foram consideradas separadamente (AMOVA 1). Na AMOVA 2, onde foram considerados os indivíduos de Itanhaém e Guaratuba como pertencentes à mesma população (localidade ‘Costa’), uma elevada variação molecular, consideravelmente maior dentro da população do que entre populações (i.e., entre ‘Costa’ e ‘Alto Tietê’), foi indicada. Já com relação à AMOVA 3, os espécimes do Alto Tietê e de Itanhaém foram considerados como uma população única e uma elevada variação molecular entre populações (i.e., entre estas bacias e Guaratuba) foi indicada. Estes resultados corroboram os resultados das análises filogenéticas e redes de haplótipo, que indicam maior similaridade genética entre as populações de Itanhaém e Alto Tietê, o que não justifica uma separação entre bacias costeiras e bacia do rio Paraná. Os valores de todos os índices de fixação da AMOVA foram considerados altamente significativos ( $p < 0,04$ ).

**Tabela 3.** Análises de variância molecular (AMOVA) de *Glandulocauda melanopleura*, com base no gene mitocondrial COI (522 pb). Na AMOVA 1, as localidades Alto Tietê, Itanhaém e Guaratuba foram consideradas como populações distintas; na AMOVA 2 foram consideradas distintas as populações das localidades ‘Alto Tietê’ e ‘Costa’; e na AMOVA 3 as populações das localidades ‘Alto Tietê\_Itanhaém’ e ‘Guaratuba’. GL: grau de liberdade;  $p < 0,04$ .

AMOVA	Níveis hierárquicos	GL	% de variação	Índice de fixação ( $F_{ST}$ )
1	Entre populações	2	99,11	0,99107
	Dentro de populações	27	0,89	
2	Entre populações	1	13,67	0,13669
	Dentro de populações	18	86,33	
3	Entre populações	1	98,39	0,98389
	Dentro de populações	18	1,61	

Assim como as análises filogeográficas, as análises de demografia histórica também foram realizadas com base na matriz mitocondrial concatenada (1059 pb). As estatísticas sumárias de cada uma das populações de *G. melanopleura* são apresentadas na Tabela 4. Apenas a população do Alto Tietê apresentou elevada diversidade haplotípica ( $H_d > 0,5$ ) e todas as populações apresentaram valores baixos de diversidade nucleotídica ( $\pi < 0,5\%$ ). Os testes de neutralidade (D e  $F_S$ ) e o teste de mudança no tamanho populacional  $R_2$  não evidenciaram nenhum sinal de expansão demográfica significativa das populações analisadas.

**Tabela 4.** Estatísticas sumárias e valores dos testes de neutralidade de D e  $F_S$  e do teste de mudança no tamanho populacional  $R_2$  relativas aos genes mitocondriais, 16S e COI, concatenados (1059 pb) de *Glandulocauda melanopleura*. N: tamanho amostral; h: número de haplótipos;  $H_d$ : diversidade haplotípica; dp: desvio padrão;  $\pi$ : diversidade nucleotídica por sítio; ns: não significativo. ‘TOTAL’ significa todas as populações juntas.

População	N	h	$H_d$ (dp)	$\pi$ (dp)	D	$F_S$	$R_2$
Alto Tietê	7	2	0,571 (0,119)	0,00055 (0,00012)	1,34164 <sup>ns</sup>	0,856 <sup>ns</sup>	0,2857 <sup>ns</sup>
Itanhaém	10	2	0,200 (0,154)	0,00019 (0,00015)	-1,11173 <sup>ns</sup>	-0,339 <sup>ns</sup>	0,3000 <sup>ns</sup>
Guaratuba	3	1	0,000	0,00000	-	-	-
TOTAL	20	5	0,747 (0,072)	0,00666 (0,00218)	0,17490 <sup>ns</sup>	5,336 <sup>ns</sup>	0,1474 <sup>ns</sup>

#### 4. Análises morfológicas

Nas análises morfológicas, foram examinados espécimes de toda a distribuição conhecida de *Glandulocauda melanopleura*, que inclui as bacias dos rios Alto Tietê (localidade tipo e adjacências), Itanhaém, Itatinga, Guaratuba e Ribeira de Iguape, no Estado de São Paulo. Para efeito de comparação, portanto, as análises foram feitas por localidade e incluíram também os *vouchers* utilizados nas análises moleculares. Os resultados das análises morfológicas foram comparados entre si e também com os apresentados por Menezes & Weitzman (2009), especialmente visando melhor compreender a variação mencionada por estes autores referente aos espécimes do rio Guaratuba, desta vez com a inclusão de um número maior de indivíduos. Menezes & Weitzman (2009) também apontam para a necessidade de analisar material do rio Itatinga, já que eles não tiveram acesso a exemplares desta população na ocasião. Esta análise também foi realizada no presente estudo.

Os dados morfométricos são apresentadas na Tabela 5 e indicam sobreposição de valores dos dados das populações de *G. melanopleura* analisadas. A mesma sobreposição é observada entre estes e os valores encontrados por Menezes & Weitzman (2009: Tabela 3, página 311) relativos ao holótipo e topótipos da espécie. Dados merísticos são apresentados qualitativa e comparativamente na Tabela 6, que inclui a amplitude de valores de cada população obtida no presente estudo, aquela apresentada por Menezes & Weitzman (2009) para o holótipo de *Glandulocauda melanogenys* e de *Hyphessobrycon melanopleurus* e topótipos de *G. melanopleura*, além da variação total de dados merísticos observada nesta espécie (i.e., presente estudo e Menezes & Weitzman, 2009). Na Fig. 5, são apresentados os gráficos *BoxPlot*, gerados com base em alguns caracteres merísticos, onde é possível observar a simetria dos dados, sua dispersão e a existência de *outliers* (dados discrepantes). Estes gráficos também indicaram que, apesar de algumas tendências, não há separação evidente com relação à maioria dos caracteres merísticos analisados. O padrão de colorido em álcool de cada um das populações pode ser observado na Fig. 6 e também não indica nenhuma diferença significativa. O padrão de colorido em vida da espécie é apresentado na Fig. 7, tendo como base indivíduos coletados na bacia do rio Guaratuba, na Estação Ecológica de Boraceia, São Paulo. Detalhes adicionais em relação a caracteres morfológicos de *G. melanopleura* são fornecidos na 'Discussão'.

**Tabela 5.** Dados morfométricos das populações de *Glandulocauda melanopleura* analisadas no presente estudo. O comprimento padrão está em mm e as demais medidas em %. N = número de espécimes examinados; DP = desvio padrão.

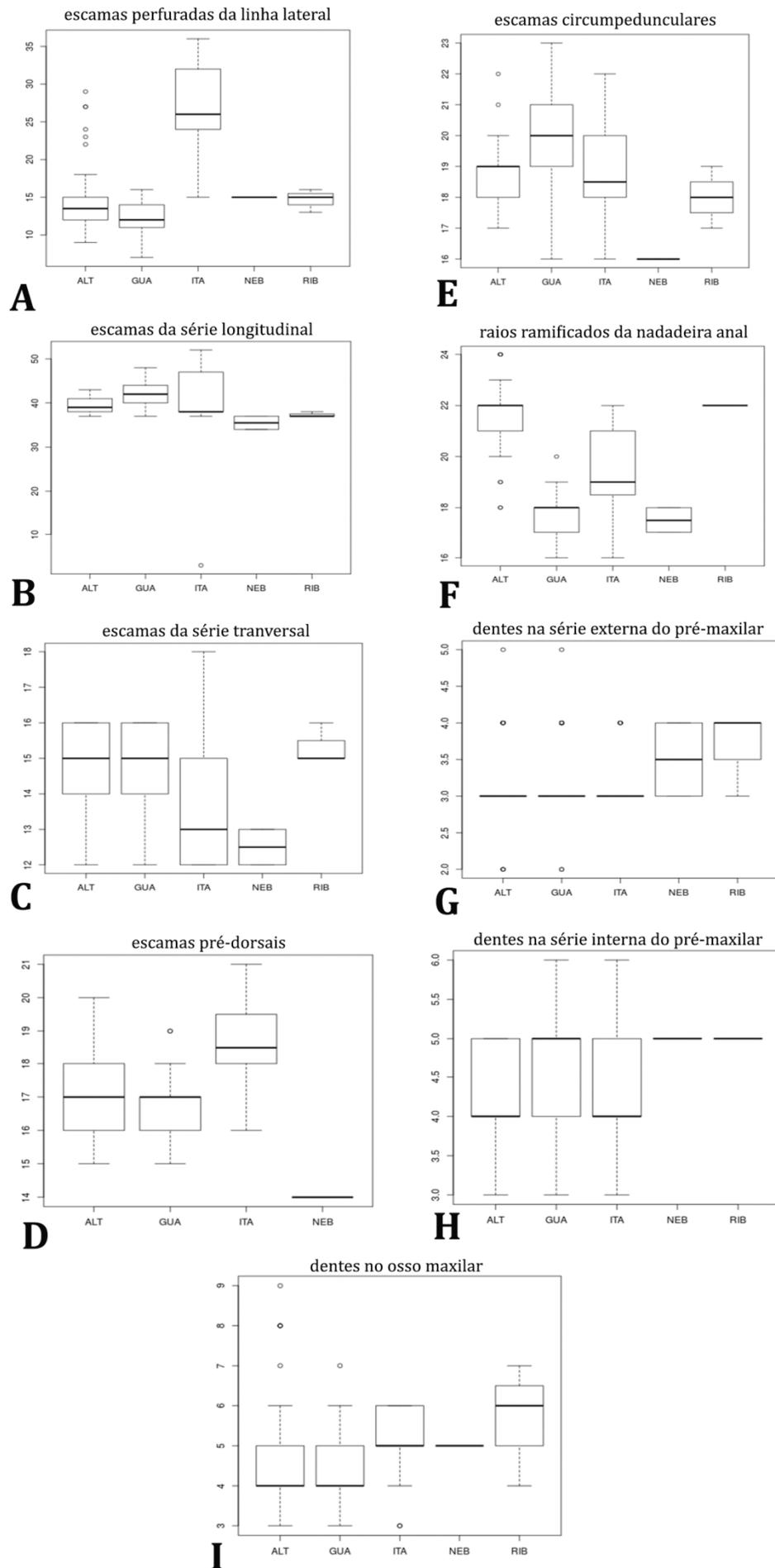
Machos	Alto Tietê					Itanhaém					Guaratuba					Ribeira de Iguape					Itatinga				
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP
Comprimento padrão (CP)	8	34,0	58,3	41,3		10	34,7	55,6	49,0		29	27,4	39,3	35,3		2	44,5	48,7	46,6		-	-	-	-	-
Altura do corpo	8	32,0	38,6	34,4	2,2	10	31,1	35,7	33,1	1,6	29	30,0	36,7	33,1	1,5	2	34,1	34,4	34,2	0,2	-	-	-	-	-
Focinho-origem dorsal	8	53,2	57,6	55,1	1,5	10	53,6	56,3	55,1	0,8	29	49,2	56,2	52,4	1,4	2	54,4	54,6	54,5	0,1	-	-	-	-	-
Focinho-origem peitoral	8	24,6	26,4	25,9	0,6	10	25,5	28,1	26,7	0,9	29	24,5	29,7	26,6	1,1	2	24,0	25,7	24,9	1,1	-	-	-	-	-
Focinho-origem pélvica	8	42,0	47,3	44,1	1,7	9	43,7	48,5	46,2	1,7	29	41,5	47,2	44,3	1,7	2	41,6	44,1	42,9	1,8	-	-	-	-	-
Focinho-origem anal	8	57,5	61,1	59,4	1,0	10	57,6	63,4	60,0	2,0	29	54,7	62,9	58,7	2,3	2	56,4	58,9	57,7	1,8	-	-	-	-	-
Altura do pênduculo caudal	8	14,3	18,2	16,0	1,4	10	15,6	17,5	16,5	0,5	29	15,1	18,1	16,8	0,8	2	16,2	16,6	16,4	0,3	-	-	-	-	-
Comprimento do pedúnculo caudal	8	10,3	15,4	12,0	1,6	10	12,2	14,8	13,7	0,9	29	11,3	15,6	13,7	1,0	2	10,1	10,6	10,3	0,4	-	-	-	-	-
Comprimento da peitoral	8	21,6	23,0	22,3	0,5	10	19,4	24,0	21,7	1,7	29	24,4	28,0	26,4	1,0	2	21,1	24,3	22,7	2,2	-	-	-	-	-
Comprimento da pélvica	8	15,1	18,0	16,4	1,0	9	14,7	17,1	15,6	0,8	29	16,8	19,9	18,3	0,7	2	14,6	16,0	15,3	1,0	-	-	-	-	-
Base da dorsal	8	11,5	15,4	13,9	1,3	10	13,3	16,4	14,4	0,9	29	14,7	18,3	16,0	0,9	2	15,0	15,7	15,4	0,5	-	-	-	-	-
Comprimento da dorsal	8	21,5	24,9	23,6	1,0	9	20,1	24,6	22,8	1,8	28	24,7	27,8	26,6	0,9	2	24,0	24,5	24,3	0,3	-	-	-	-	-
Base da anal	8	30,7	37,8	35,4	2,2	10	30,0	37,7	32,4	2,6	29	30,2	36,1	32,5	1,4	2	36,2	36,6	36,4	0,3	-	-	-	-	-
Comprimento da anal	8	19,4	22,3	21,1	1,0	9	17,6	25,3	20,7	2,5	29	22,6	26,4	24,6	1,1	1	22,0	22,0	22,0	-	-	-	-	-	-
Olho-origem dorsal	8	42,2	47,0	44,2	1,7	10	42,4	46,1	44,3	1,3	29	39,7	44,8	42,0	1,3	2	44,1	44,5	44,3	0,2	-	-	-	-	-
Origem dorsal-base caudal	8	47,4	51,4	49,7	1,2	10	46,1	54,3	51,1	2,2	29	49,3	55,3	51,8	1,5	2	50,7	50,8	50,8	0,0	-	-	-	-	-
Comprimento da cabeça	8	24,4	26,4	25,4	0,6	10	24,2	27,5	25,5	1,0	29	23,7	28,5	25,7	1,1	2	23,8	24,6	24,2	0,6	-	-	-	-	-
Diâmetro do olho	8	26,0	32,0	30,4	2,0	10	24,5	32,7	27,2	3,0	29	25,7	33,3	29,7	1,6	2	29,2	30,2	29,7	0,7	-	-	-	-	-
Comprimento do focinho	8	22,0	26,6	24,3	1,6	10	21,6	26,9	24,3	1,7	29	18,6	31,7	24,0	2,2	2	23,6	24,2	23,9	0,4	-	-	-	-	-
Espaço interorbital	8	32,0	37,7	35,1	1,9	10	35,3	38,3	36,7	1,0	29	30,8	43,2	35,1	2,5	2	35,8	35,8	35,8	0,0	-	-	-	-	-
Comprimento da maxila superior	8	42,2	48,9	44,9	2,0	10	44,9	50,0	46,5	1,7	29	43,8	51,7	47,9	2,1	2	45,8	49,1	47,4	2,3	-	-	-	-	-

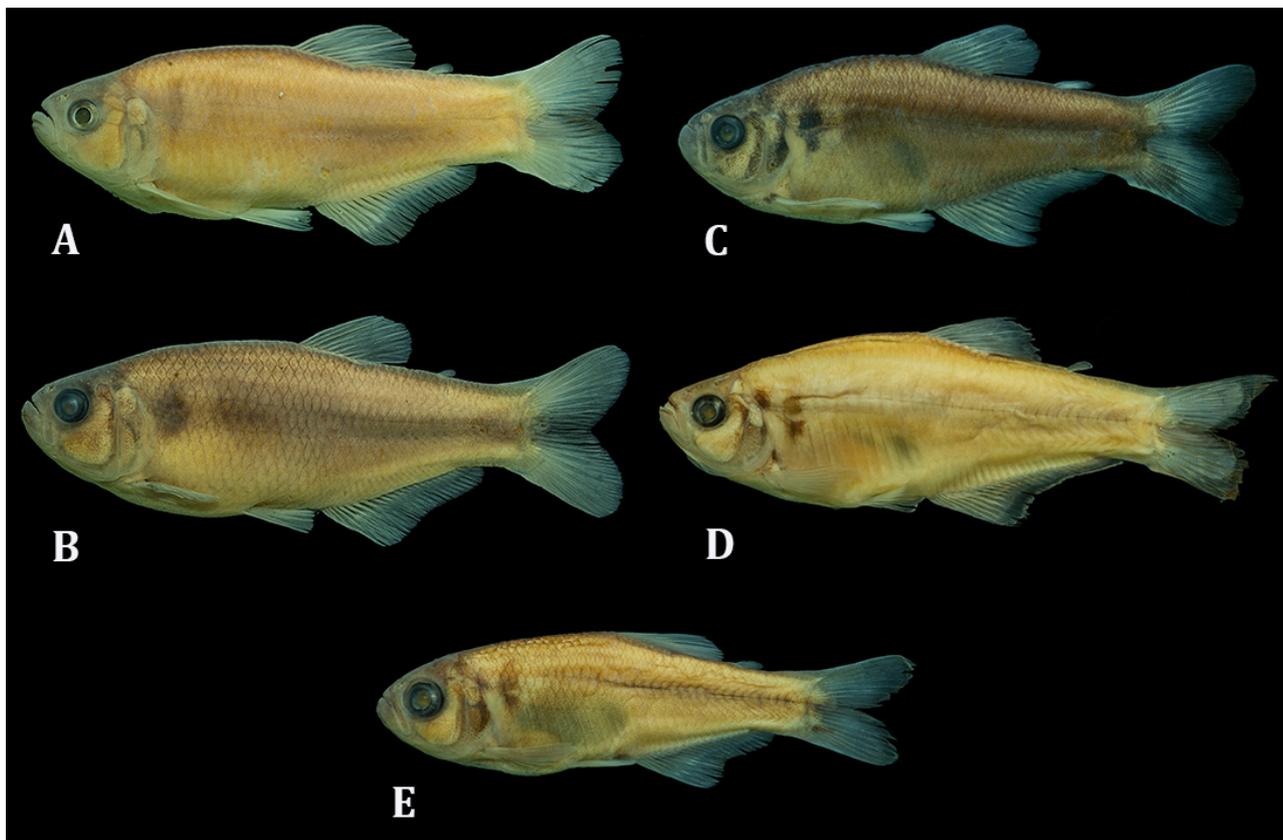
Fêmeas ou Imaturos	Alto Tietê					Itanhaém					Guaratuba					Ribeira de Iguape					Itatinga				
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP
Comprimento padrão (CP)	14	24,9	43,6	30,0		6	29,1	42,1	35,5		36	17,9	42,7	31,7		-	-	-	-		2	26,2	26,6	26,4	
Altura do corpo	14	26,6	33,2	29,9	2,1	6	26,9	33,3	29,4	2,2	36	28,7	34,3	31,1	1,5	-	-	-	-		2	30,1	30,9	30,5	0,6
Focinho-origem dorsal	14	53,0	56,8	54,4	1,0	6	53,9	57,0	55,0	1,1	36	50,5	56,4	53,6	1,3	-	-	-	-		2	54,9	56,1	55,5	0,9
Focinho-origem peitoral	14	23,8	26,9	25,8	0,9	6	24,7	30,2	26,9	2,0	36	24,9	28,7	26,8	1,0	-	-	-	-		2	27,1	28,2	27,7	0,8
Focinho-origem pélvica	14	40,2	45,5	43,6	1,6	6	43,9	46,8	45,6	1,1	36	43,1	48,0	45,0	1,2	-	-	-	-		2	46,6	47,0	46,8	0,3
Focinho-origem anal	14	57,3	61,8	59,7	1,2	6	57,3	64,9	61,2	2,6	36	57,9	65,8	60,4	1,7	-	-	-	-		2	61,1	62,0	61,5	0,7
Altura do pedúnculo caudal	14	11,1	15,1	12,8	1,0	6	13,3	15,2	14,4	0,7	36	12,3	16,2	14,8	0,8	-	-	-	-		2	15,0	15,6	15,3	0,4
Comprimento do pedúnculo caudal	14	8,5	12,4	10,6	1,1	6	11,1	14,9	12,8	1,3	36	9,5	15,7	12,9	1,5	-	-	-	-		2	12,6	12,8	12,7	0,1
Comprimento da peitoral	14	19,0	23,3	21,3	1,4	6	18,2	22,6	20,1	1,4	36	21,9	26,2	24,0	1,0	-	-	-	-		2	21,8	22,1	22,0	0,2
Comprimento da pélvica	14	12,9	16,7	14,4	1,0	6	14,1	16,1	15,0	0,8	36	14,4	17,1	15,7	0,7	-	-	-	-		2	16,2	17,2	16,7	0,7
Base da dorsal	14	10,2	14,1	12,5	1,0	4	12,6	13,8	13,0	0,5	36	12,8	16,5	14,5	0,8	-	-	-	-		2	16,2	16,4	16,3	0,2
Comprimento da dorsal	13	19,5	25,3	22,5	1,6	4	20,6	24,9	22,9	2,0	36	22,6	28,0	25,3	1,6	-	-	-	-		2	27,9	28,2	28,0	0,2
Base da anal	14	32,1	37,3	34,2	1,5	6	26,6	31,3	28,7	2,0	36	28,4	32,6	30,6	1,2	-	-	-	-		2	27,9	29,3	28,6	1,0
Comprimento da anal	14	18,4	22,5	21,1	1,1	6	16,7	22,1	19,6	2,0	35	20,5	25,1	23,0	1,2	-	-	-	-		2	21,4	22,1	21,8	0,5
Olho-origem dorsal	14	40,3	44,6	42,6	1,3	6	42,0	45,0	43,4	1,1	36	40,5	55,3	43,1	2,3	-	-	-	-		2	42,1	43,1	42,6	0,7
Origem dorsal-base caudal	14	44,2	51,1	47,3	1,7	6	47,1	51,9	48,9	1,7	36	48,0	52,5	50,0	1,3	-	-	-	-		2	48,5	48,9	48,7	0,3
Comprimento da cabeça	14	23,2	27,7	25,5	1,2	6	23,5	27,5	25,9	1,4	36	24,1	29,6	26,4	1,2	-	-	-	-		2	28,2	28,6	28,4	0,3
Diâmetro do olho	14	29,6	37,1	33,8	1,9	6	27,6	31,6	29,5	1,6	36	28,0	35,2	31,2	1,9	-	-	-	-		2	29,3	30,7	30,0	0,9
Comprimento do focinho	14	19,1	27,3	23,6	2,1	6	20,3	23,9	22,1	1,3	36	18,4	27,8	23,6	2,2	-	-	-	-		2	22,7	24,0	23,3	0,9
Espaço interorbital	14	31,4	39,1	35,5	2,2	6	33,7	37,6	35,2	1,4	36	30,8	41,0	36,1	2,4	-	-	-	-		2	30,7	33,3	32,0	1,9
Comprimento da maxila superior	14	41,7	46,7	43,9	1,2	6	45,6	50,0	47,7	1,8	36	42,5	51,0	47,2	2,3	-	-	-	-		2	45,3	46,7	46,0	0,9

**Tabela 6.** Dados merísticos de *Glandulocauda melanopleura*, incluindo a amplitude de valores referentes a cada população analisada no presente estudo, aquela apresentada por Menezes & Weitzman (2009) para o holótipo de *Hyphessobrycon melanopleurus*, *Glandulocauda melanogenys* e topótipos\*\* da espécie, além da variação total de dados. Contagens obtidas a partir de exemplares diafanizados e corados (d&c) são indicadas por \*: Alto Tietê, 2 exs; Itanhaém, 2 exs.; Guaratuba, 2 exs..

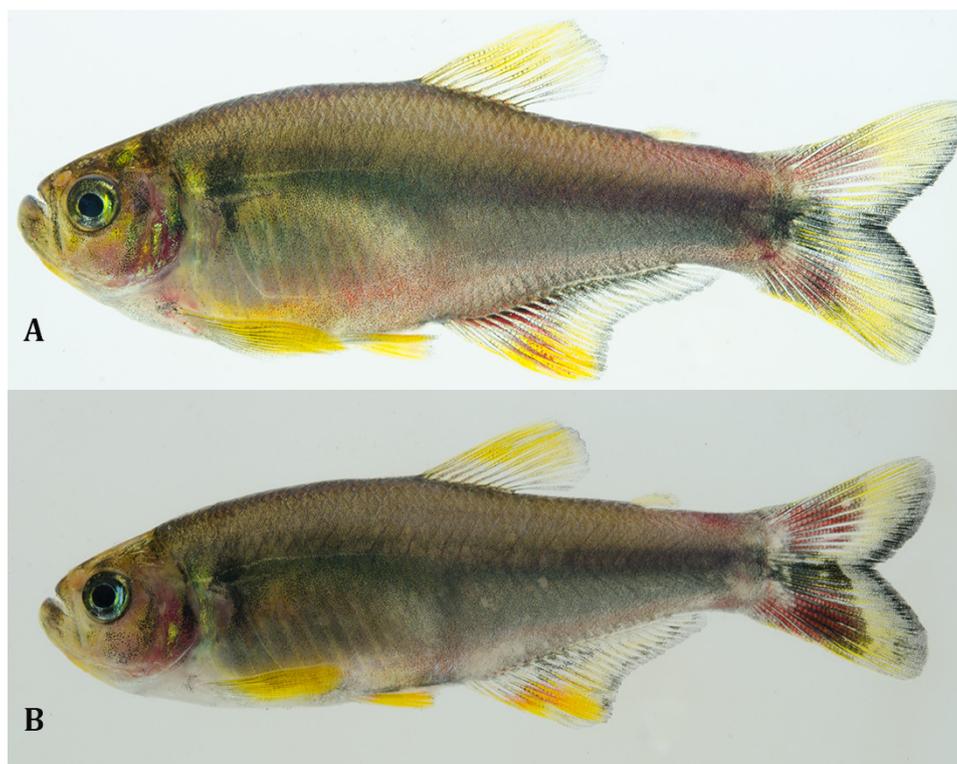
Características	Presente estudo					Menezes & Weitzman (2009)			Variação total 184 exs.
	Alto Tietê 36 exs.	Itanhaém 16 exs.	Guaratuba 65 exs.	Ribeira de Iguape 3 exs.	Itatinga 2 exs.	Alto Tietê** 63 exs.	<i>H. melanopleurus</i> HOLÓTIPO	<i>G. melanogenys</i> HOLÓTIPO	
Escamas perfuradas LL	9 a 27	18 a 37	7 a 16	13 a 16	15	7 a 27	7	12	7 a 37
Escamas linha longitudinal	32 a 43	37 a 52	37 a 48	37 ou 38	34 ou 37	37 a 42	39	40	32 a 52
Escamas série transversal	12 a 16	12 a 18	12 a 16	15 ou 16	12 ou 13	13 a 16	14	15	12 a 18
Escamas pré-dorsais	15 a 20	16 a 21	15 a 19	sem dado	14	15 a 18	15	16	14 a 21
Escamas circumpedunculares	17 a 22	16 a 22	16 a 23	17 a 19	16	17 a 19	18	18	16 a 23
Raios ramificados anal	18 a 24	16 a 22	16 a 20	22	17 ou 18	20 a 25	22	22	16 a 25
Raios dorsal	ii ou iii,8	ii,8	ii,7 a 9	ii,8	ii,8	ii,8 ou 9	ii,8	ii,8	ii ou iii,7 a 9
Raios peitoral	i,10 a 12	i,9 a 12	i,10 a 12	i,11	i,10	i,9 a 13	i,11	i,11	i,9 a 13
Raios pélvica	i,6/7/i,7	i,6 /7/i,7	6/i,6/7/i,7/8	7	7	i,6/7/i,8	i,6	7	6/i,6/7/i,7/8/i,8
Dentes pré-maxilar externo	2 a 5	3 ou 4	2 a 5	3 ou 4	3 ou 4	2 a 5	3	5	2 a 5
Dentes pré-maxilar interno	4 ou 5	3 a 6	4 a 6	5	5	4 ou 5	4	3	2 a 6
Dentes maxilar	3 a 9	3 a 6	3 a 7	4 a 7	5	3 a 9	6	4	3 a 9
Vértebras*	37	37	37	sem dado	sem dado	36 a 38	36	37	36 a 38
Raios branquiostegais*	4	4	4	sem dado	sem dado	4	sem dado	sem dado	4
Supraneurais*	8	8	8	sem dado	sem dado	sem dado	sem dado	sem dado	8



**Figura 5.** Gráficos *BoxPlot*, indicando a variação de alguns caracteres merísticos entre as populações de *Glandulocauda melanopleura* analisadas no presente estudo: ALT, Alto Tietê; GUA, Guaratuba; ITA, Itanhaém; NEB, Itatinga; e RIB, Ribeira de Iguape.



**Figura 6.** Colorido em álcool de cada uma das populações de *Glandulocauda melanopleura* analisadas no presente estudo: (A) Alto Tietê, MZUSP 86967, macho, 58,4 mm CP; (B) Itanhaém, MZUSP 111017, macho, 50 mm CP; (C) Guaratuba, MZUSP 115244, macho, 39,4 mm CP; (D) Ribeira de Iguape, MZUSP 79429, macho, 48,9 mm CP; e (E) Itatinga, DZSJRP 6613, juvenil, 26,2 mm CP. Fotos: F. P. Dagosta.



**Figura 7.** Colorido em vida de *Glandulocauda melanopleura*, MZUSP 115244 Guaratuba: (A) macho, 39,4 mm CP e (B) fêmea, 35 mm CP. Fotos: F. P. Dagosta.

## 5. Discussão

Apesar de imprecisões sobre a localidade tipo, discutidas em profundidade por Menezes & Weitzman (2009: página 316), não há dúvidas de que *Glandulocauda melanopleura* foi descrita com base em material coletado nas cabeceiras do rio Tietê, no atual município de Santo André, São Paulo. O Tietê é um dos principais afluentes da margem esquerda do rio Paraná e drena a parte sudeste do escudo cristalino brasileiro, em áreas de planalto (Langeani *et al.*, 2007). O primeiro registro oficial de *G. melanopleura* em uma drenagem que não fosse afluente do rio Paraná, foi o de Ribeiro *et al.* (2006), que registraram a espécie na Estação Biológica de Boracéia (EBB), no rio Guaratuba, uma drenagem costeira que deságua diretamente no Oceano Atlântico, em Bertioga (SP). O alto e baixo cursos do rio Guaratuba estão separados por uma escarpa de cerca de 800 m, representada pela frente abrupta da extensão costeira da Serra do Mar (Ribeiro *et al.*, 2006). Assim, apesar do Guaratuba ser um rio costeiro, apenas seu curso inferior drena áreas mais baixas da planície litorânea, e suas cabeceiras, onde *G. melanopleura* foi coletada (entre 800-830 m), estão localizadas em áreas mais altas do escudo cristalino brasileiro. No ano seguinte, Serra *et al.* (2007) registraram a ocorrência da espécie na RPPN Parque das Neblinas, em outro rio costeiro, o rio Itatinga, afluente do Itapanhaú, que também desemboca diretamente no oceano em Bertioga. Mais uma vez, entretanto, *G. melanopleura* foi registrada apenas na parte mais alta da bacia, em um único ponto de coleta a 940 m de altitude. Um terceiro registro da espécie em uma drenagem que não é afluente do rio Paraná, foi apresentado por Menezes *et al.* (2007), que chamaram a atenção para a ocorrência de *G. melanopleura* na bacia do rio Ribeira de Iguape, na cidade de Jujutiba, também em São Paulo. Mais uma vez, apesar do Ribeira ser uma bacia independente, que deságua diretamente no oceano em região de planície litorânea, *G. melanopleura* foi coletada em um tributário do rio Juquiá, um dos seus afluentes, a aproximadamente 730 m de altitude (MZUSP 79429). Finalmente, durante o presente estudo, a espécie também foi coletada no rio Capivari, afluente do rio Branco, bacia do rio Itanhaém, na APA Capivari-Monos, entre os municípios de São Paulo e Itanhaém (SP). Este é o quarto registro da espécie em uma bacia costeira e, mais uma vez, o quarto que indica que *G. melanopleura* foi registrada apenas em partes mais altas das drenagens (neste caso, entre 750-810 m). Todas estas informações, incluindo as mais recentes, corroboram a hipótese de Menezes & Weitzman (2009) de que, apesar de *G. melanopleura* não ser uma espécie endêmica da bacia do Alto Tietê, como era considerada até pouco tempo atrás (*e.g.*, Weitzman, 2003; Menezes, 2007), aparentemente, sua distribuição está restrita às regiões de elevadas altitudes da parte sudeste do escudo cristalino

brasileiro, incluindo aqui as bacias costeiras, onde a espécie só ocorre nas cabeceiras (em torno de 800 m). Aqui, é importante ressaltar que inúmeras expedições de campo foram realizadas em trechos de menor altitude destas bacias (inclusive durante o presente estudo) e, em nenhuma delas, foram coletados espécimes de *G. melanopleura*. Na ocasião do seu mestrado, por exemplo, Ferreira (2007) fez um levantamento da ictiofauna de riachos da planície costeira da bacia do rio Itanhaém e adjacências e, das 37 espécies amostradas, apenas dois glandulocaudíneos foram coletados: *Mimagoniates lateralis* e *M. microlepis*.

As análises filogenéticas (IB e MV) realizadas no presente estudo, baseadas em sequências de dois genes mitocondriais (16S e COI concatenados, 1059 pb) de topótipos e espécimes de *G. melanopleura* das bacias dos rios Itanhaém e Guaratuba, indicaram presença de estruturação genética dentro da espécie, com a distinção clara de dois clados: (1) (Alto Tietê, Itanhaém) e (2) Guaratuba. Aqui, é importante ressaltar que, apesar dos resultados não terem sido apresentados, as mesmas análises foram realizadas levando-se em consideração cada um dos genes separadamente e os resultados do grupo interno foram os idênticos aos obtidos a partir da matriz concatenada. Apesar desta estruturação, todas as análises filogenéticas realizadas recuperaram *G. melanopleura* como uma unidade monofilética. O mesmo, no entanto, não aconteceu com relação ao gênero *Glandulocauda*, que é proposto como parafilético, uma vez que *G. melanopleura* e *G. caerulea*, sua única congênera, não formaram um clado. A hipótese aqui apresentada sugere que a primeira espécie está mais relacionada a *Lophiobrycon weitzmani* enquanto a segunda formou um clado com as espécies de *Mimagoniates* analisadas. O monofiletismo de *G. melanopleura* nunca foi questionado na literatura, mas em todos os estudos filogenéticos realizados, tanto com base em dados morfológicos (e.g., Menezes & Weitzman, 2009) quanto com base em dados moleculares (e.g., Oliveira *et al.*, 2011), só foram incluídos espécimes da localidade tipo ou adjacências. Assim, este se trata do primeiro estudo que inclui material de outras bacias além daquele do Alto Tietê. A relação (*G. melanopleura*, *L. weitzmani*) é recuperada em todos os estudos moleculares que incluíram estas espécies (e.g., Oliveira *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2015a), enquanto os estudos morfológicos apontam para relação mais estreita entre (*G. melanopleura*, *G. caerulea*) e *Mimagoniates* spp. (e.g., Menezes & Weitzman, 1990, 2009; Menezes *et al.*, 2008) e este clado seria grupo irmão de *L. weitzmani* (Menezes & Weitzman, 2009). Aqui, é importante mencionar que nenhuma análise molecular realizada até o presente estudo incluiu espécimes de *G. caerulea*, de maneira que não há outras propostas filogenéticas disponíveis para comparação com os resultados aqui obtidos. A discussão a respeito da hipótese de parafilético do gênero *Glandulocuada* foi feita no Capítulo 1 desta tese e não será aqui repetida.

Com o objetivo de melhor compreender a história evolutiva de *G. melanopleura*, foram aplicados, no presente estudo, dois métodos de identificação molecular de espécies, o clássico e mais tradicional *DNA barcoding* e o GMYC e ambos foram congruentes com a estruturação sugerida mediante as hipóteses filogenéticas baseadas no mtDNA. De acordo com os resultados do GMYC, método estatístico que combina modelos de diversificação entre espécies com a teoria da coalescência (Reid & Carstens, 2012; Fujisawa & Barraclough, 2013; Roxo *et al.*, 2015), os clados propostos em relação a *G. melanopleura* representam linhagens independentes. Assim, levando em consideração os resultados desta análise, as populações do (Alto Tietê, Itanhaém) e Guaratuba deveriam ser consideradas espécies distintas. Aqui, no entanto, é importante ressaltar que, apesar das bases teóricas fortes do GMYC, este método tende a reconhecer mais unidades evolutivas distintas do que outros (*e.g.*, Talavera *et al.*, 2013; Kekkonen *et al.*, 2014) e este tipo de resultado já foi registrado na literatura para outras espécies de peixes neotropicais (*e.g.*, Costa-Silva *et al.*, 2015; Roxo *et al.*, 2015). A divergência genética entre as linhagens distintas propostas pelo GMYC (equivalente aos clados das análises filogenéticas) foi de 3%, que é um valor um pouco acima do que é considerado limiar para separação de espécies pelo método do *DNA Barcoding* (2%, *e.g.*, Ward *et al.*, 2009; Valdez-Moreno *et al.*, 2009, April *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013). Apesar da eficiência do *DNA Barcoding* ter sido testada tanto na identificação de espécies de peixes marinhos (*e.g.*, Ward *et al.*, 2005; Mabragaña *et al.*, 2011) quanto de água doce (*e.g.*, Hubert *et al.*, 2008; Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011) com taxas de sucesso em torno de 90%, este ainda é um método considerado um tanto quanto arbitrário na delimitação de espécies, já que os organismos evoluem de forma distinta (*e.g.*, Barraclough *et al.*, 2009). Além disso, em táxons com pouca capacidade de dispersão e pouco ou nenhum fluxo gênico, como é o caso de *G. melanopleura*, a extinção de haplótipos intermediários também pode contribuir para o aparecimento de divergências genéticas pronunciadas entre as diferentes populações (Avise, 2000). Assim, os resultados encontrados por meio do GMYC e do método de *DNA Barcoding* podem ser reflexo da acumulação de mutações ao longo do tempo e estes clados podem não se tratar, necessariamente, de espécies distintas, um cenário relativamente comum em táxons cujas diferentes populações estão isoladas geograficamente (Bickford *et al.*, 2007), como no caso de *G. melanopleura*. Por outro lado, estes métodos têm se mostrado uma ferramenta muito útil para fornecer evidências de unidades evolutivas independentes ou unidades taxonômicas operacionais (Costa-Silva *et al.*, 2015) e, muitas vezes, têm sido um excelente ponto de partida para trabalhos de taxonomia tradicional (Kekkone & Hebert, 2014). Aqui, é importante ressaltar que, apesar de terem sido encontradas algumas diferenças morfológicas entre as

populações de *G. melanopleura*, estas não foram consideradas suficientes para reconhecê-las como espécies distintas, em virtude da sobreposição de caracteres. Entretanto, os resultados propostos através de GMYC, *DNA Barcoding* e também das análises filogenéticas, foram cruciais para nortear as análises morfológicas realizadas, que culminaram no entendimento mais completo da espécie.

Por outro lado, ainda que os dados morfológicos não corroborem os resultados da análise de GMYC e de *DNA barcoding* e nenhuma alteração seja feita na taxonomia de *G. melanopleura*, é necessário chamar a atenção para a necessidade de conservação das diferentes populações analisadas, já que elas representam linhagens distintas. Segundo Menezes *et al.* (2007) e Menezes & Lima (2008), *G. melanopleura* é uma espécie que só é coletada em riachos de áreas florestadas, com boa qualidade de água, sendo, certamente, muito sensível às alterações ambientais. Estas características aliadas ao fato da sua distribuição original no Alto Tietê ter sido reduzida, muito provavelmente por desmatamento e poluição, foram responsáveis pelo enquadramento na espécie na categoria de ameaça “Em Perigo” em 2008 (ver Rosa & Lima, 2008). Segundo os critérios da IUCN (2001) e adotados pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, órgão do governo responsável, entre outras coisas, pela avaliação do estado de conservação das espécies da fauna brasileira), esta categoria deve ser utilizada quando “a melhor evidência disponível indica que a espécie em questão poderá ser extinta em um futuro próximo”. Recentemente, a lista de espécies de peixes de água doce ocorrentes no Brasil e ameaçadas de extinção foi atualizada pelo ICMBio. No entanto, nesta nova lista, publicada em 2014 e disponível em <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>, apenas *G. caerulea* foi enquadrada em categoria de ameaça. A não inclusão de *G. melanopleura* pode ter sido em função das novas informações de distribuição da espécie (apresentadas anteriormente), bem como pelo fato da mesma ocorrer em quatro áreas de conservação: REBIO do Alto da Serra de Paranapiacaba, Estação Biológica de Boracéia, Parque das Neblinas e APA Capivari-Monos. Os resultados obtidos no presente estudo, no entanto, indicam que talvez seja o caso de reavaliar esta decisão. Em primeiro lugar, dadas as divergências genéticas encontradas entre as populações do (Alto Tietê, Itanhaém) e Guaratuba, para uma conservação eficaz da espécie, esta deve ser feita em escala regional, buscando, ao final, a manutenção de ambas as linhagens. Além disso, como será discutido adiante, apesar das análises de GMYC e *DNA Barcoding* indicarem que as populações do Alto Tietê e Itanhaém pertencem à mesma linhagem, estas bacias têm haplótipos exclusivos, e a perda destes haplótipos pode representar uma redução significativa da diversidade genética da espécie, cuja manutenção depende da

preservação destas áreas independentemente. Neste contexto, é importante destacar que, assim como cada espécie requer estratégias de manejo particulares, populações de uma espécie podem apresentar diferenças adaptativas ou genéticas significativas (Frankham *et al.*, 2002) que significam necessidades de planos de manejo próprios. Outro ponto interessante de se levantar neste aspecto, diz respeito à ocorrência da espécie nas bacias dos rios Ribeira de Iguape e Itatinga. Apesar de estes registros indicarem que a distribuição de *G. melanopleura* é mais ampla do que se tinha conhecimento, é importante destacar que foram coletados pouquíssimos exemplares da espécie e há mais de 10 anos: Ribeira, MZUSP 79429, três exemplares em 1999 e Itatinga, DZSJRP 6613, dois exemplares em 2004. Apesar dos esforços atuais e, muitas vezes, direcionados à captura da espécie nestas bacias (*e.g.*, coletas do LBP à bacia do Ribeira, C. Oliveira, comunicação pessoal; presente estudo), nenhum espécime adicional foi coletado, o que pode indicar que estas populações estejam em declínio. Aqui, é importante destacar que, na bacia do Ribeira, os exemplares foram coletados a jusante de uma represa, em uma fazenda e que, apesar do trecho amostrado do rio Itatinga drenar uma área protegida hoje, o Parque das Neblinas já foi, por muitos anos, área de exploração de palmito e outras espécies nativas da Mata Atlântica (Correa, 2006), o que pode ter afetado a sobrevivência destas populações. Segundo Menezes *et al.* (2007), *G. melanopleura* depende muito da vegetação, seja ela marginal ou aquática, visto que esta espécie é encontrada costumeiramente nadando entre as raízes de plantas aquáticas próximo à superfície, em áreas protegidas pela mata. Assim, a alteração ou destruição deste tipo específico de habitat poderia causar extinções pontuais ao longo da distribuição da espécie (Menezes & Weitzman, 2009).

Em relação à história demográfica das populações de *G. melanopleura* analisadas, os testes de neutralidade ( $D$  e  $F_s$ ) não foram significativos ( $p > 0,05$ ) e, assim, não foi possível rejeitar a hipótese nula de equilíbrio populacional. O mesmo resultado foi encontrado em relação ao teste de mudança no tamanho populacional ( $R_2$ ), que, apesar de ser considerado um bom teste para detectar expansão em amostras pequenas (Ramos-Onsis & Rozas, 2002), não revelou resultados estatísticos significantes. Outra abordagem útil para inferir a história demográfica de uma população a partir de genealogias, inclui a análise dos índices de diversidade haplotípica ( $H_d$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ), que, quando interpretados de forma combinada, podem fornecer informações valiosas a respeito da história das populações (Avice, 2000). Grant & Bowen (1998) fizeram comparações empíricas entre os valores de  $H_d$  e  $\pi$  para fazer inferências sobre a história demográfica de várias espécies de peixes marinhos e apresentaram um resumo interessante sobre as possíveis explicações para os resultados encontrados. A combinação de valores elevados de diversidade haplotípica (*i.e.*,  $H_d > 0,5$ ) com

diversidade nucleotídica baixa (i.e.,  $\pi < 0,5\%$ ), como encontrado na população do Alto Tietê ( $Hd=0,6$  e  $\pi=0,05\%$ ), pode ser atribuída à expansão após um período de pequeno tamanho efetivo da população; neste caso, com o rápido crescimento populacional, há pouco tempo para que diferenças nas sequências sejam acumuladas, mas há tempo suficiente para que haja variação haplotípica (Grant & Bowen, 1998; Avise, 2000). Na população de Itanhaém, apareceram valores baixos para ambos os índices ( $Hd=0,2$  e  $\pi=0,02\%$ ) e a combinação destes resultados pode ser reflexo de um gargalo populacional recente ou efeito fundador (por uma ou poucas linhagens do mtDNA) (Grant & Bowen, 1998; Avise, 2000). Na bacia do rio Guaratuba, foram analisadas sequências de três espécimes e um único haplótipo foi identificado. Partindo da premissa que quanto mais altos forem os valores de  $\pi$ , mais antiga e estável tende ser a população (Spellman & Klicka, 2006), a drenagem do Alto Tietê parece representar o ponto de origem e diversificação de *G. melanopleura*, com ocupação posterior das cabeceiras das bacias litorâneas analisadas. Este resultado está de acordo com a hipótese de Weitzman *et al.* (1988) e Menezes *et al.* (2008) em Glandulocaudini, já que, segundo estes autores, o grupo teria se originado na bacia do alto rio Paraná, com posterior ocupação das cabeceiras de bacias costeiras adjacentes, no escudo cristalino brasileiro. Em relação ao gênero *Glandulocauda* propriamente dito, este resultado também está de acordo com o proposto na literatura por Ribeiro *et al.* (2006) e Menezes *et al.* (2008). Segundo estes autores, é provável que o ancestral do gênero fosse endêmico da bacia do rio Paraná e a ocupação das cabeceiras de rios costeiros, como o Guaratuba, por exemplo, tenha sido consequência de um evento vicariante secundário.

Os resultados da rede de haplótipos e da AMOVA, baseados na matriz mitocondrial concatenada, corroboraram evidências de forte estruturação genética e fragmentação alopátrica em *G. melanopleura*, com a separação clara entre a população da bacia do rio Guaratuba daquelas das bacias dos rios Alto Tietê e Itanhaém. Apesar das similaridades genéticas apontadas nos indivíduos destas últimas bacias, a rede evidenciou que não há compartilhamento de haplótipos entre elas, apontando para uma estruturação ainda mais específica. Aqui, é importante ressaltar que, apesar dos resultados não terem sido apresentados, as mesmas análises foram realizadas para cada um dos genes separadamente e a separação (Alto Tietê, Itanhaém)/Guaratuba foi encontrada em todas as análises. A rede baseada apenas no gene COI é idêntica à concatenada (inclusive com haplótipos exclusivos nas bacias dos rios Alto Tietê e Itanhaém), exceto pelo número de passos mutacionais que separam o haplótipo de Guaratuba do haplótipo central do Alto Tietê, que é menor (14 vs. 19 passos da concatenada). Já o 16S indicou a existência de apenas dois haplótipos, um exclusivo na bacia do rio Guaratuba e outro compartilhado entre o Alto Tietê e Itanhaém. Além da estruturação, os

resultados das AMOVAs e das redes de haplótipos indicam também que a separação entre bacias costeiras e bacia do rio Paraná não se justifica, corroborando a ideia de que a formação de sistemas de drenagens se dá de forma dinâmica e o intercâmbio de fauna entre trechos de bacias vizinhas é um fenômeno relativamente comum, especialmente no leste do escudo cristalino brasileiro, cenário de uma série de reativações tectônicas recentes (Ribeiro, 2006; Lima & Ribeiro, 2011). Tudo indica, portanto, que a maior similaridade genética entre indivíduos do Alto Tietê e Itanhaém do que entre aqueles das duas bacias costeiras (Itanhaém e Guaratuba) está dentro do esperado tendo em vista a história de formação das bacias.

Os resultados do presente estudo indicam também que, para as populações analisadas de *G. melanopleura*, é possível identificar duas das cinco categorias filogeográficas propostas por Avise *et al.* (1987). De acordo com estes autores, existe um contínuo de padrões filogeográficos possíveis, que vai desde uma separação mais antiga, em que o monofiletismo recíproco claramente demonstra fragmentação alopátrica, até um sinal fraco de estruturação causado pela separação recente ou existência de fluxo gênico atual entre as populações. A separação entre o filogrupo (Alto Tietê, Itanhaém) e Guaratuba enquadra-se na categoria filogeográfica do tipo I, que significa a existência de alta divergência genética (i.e., separação através de grande número de mutações) e linhagens alopátricas (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000), associadas, provavelmente, à presença de uma barreira conspícua ao fluxo gênico durante longos períodos de tempo (Martins & Domingues, 2011). Este é um resultado relativamente comum em espécies de peixes de água doce, que, via de regra, ocorrem em bacias isoladas e não apresentam fluxo gênico (Avise, 2000), como é o caso de *G. melanopleura*. Já o padrão filogeográfico entre os haplótipos do Alto Tietê e Itanhaém pode ser identificado como o do tipo III, caracterizado pela pequena divergência genética e linhagens alopátricas. Nesta categoria, os alelos são filogeneticamente próximos, mas separados espacialmente, o que pode ser fruto de uma história compartilhada entre as populações, mas com diminuição ou interrupção recente do fluxo gênico (Avise, 2000; Martins & Domingues, 2011). As estimativas de tempo de divergência, obtidas com base na matriz do gene COI, ajudam a corroborar esta hipótese, uma vez que apontam para uma separação bem recente, datada do final do Pleistoceno, para as populações do Alto Tietê e Itanhaém.

Segundo Menezes *et al.* (2008), as exigências ambientais de *G. melanopleura*, encontrada apenas em riachos de águas claras de primeira e segunda ordens em áreas de elevadas altitudes, pode explicar a atual distribuição disjunta e relictual da espécie, cujo ancestral, provavelmente, era amplamente distribuído no alto curso da bacia do rio Paraná. Os resultados obtidos no presente estudo através do mtDNA concordam com esta hipótese.

*Glandulocauda melanopleura* ocorre em trechos restritos e atualmente isolados de bacias hidrográficas, costeiras ou não, que drenam parte da Serra do Mar no Estado de São Paulo. Como mencionado anteriormente, não há compartilhamento de haplótipos entre as localidades analisadas, o que indica que estas populações tiveram fluxo gênico interrompido há tempo suficiente para que elas tenham atingido monofiletismo recíproco. Isto significa que, muito provavelmente, após a subdivisão populacional no passado e após contínuos eventos de extinção das linhagens ancestrais, os indivíduos das “populações filhas” (i.e., das localidades analisadas) passaram a compartilhar entre si um ancestral mais recente do que o ancestral que compartilhavam com o da outra população (Tajima, 1983). Este resultado está de acordo com o esperado em relação ao mtDNA, que tende a atingir o monofiletismo recíproco em pouco tempo, especialmente entre populações com pouco ou nenhum fluxo gênico (Moore, 1995; Martins & Domingues, 2011), como aquelas em questão. Assim, as quebras filogeográficas observadas ao longo da distribuição de *G. melanopleura* podem ser associadas à geomorfologia da área em que a espécie ocorre, visto que as três populações analisadas estão isoladas por parte das cadeias montanhosas que formam a Serra do Mar, e também às peculiaridades ambientais da espécie, que tende a ocorrer em pequenos trechos restritos de riachos de primeira e segunda ordens. Aqui, é válido ressaltar que estas peculiaridades ficaram bem evidentes ao longo do presente estudo: *G. melanopleura* de fato não é uma espécie amplamente distribuída, mesmo nas bacias em que ocorre, e seus indivíduos, via de regra, estão restritos a partes específicas destas drenagens, no geral caracterizadas por trechos encaixados e poços de maior profundidade.

Thomaz *et al.* (2015b) sugerem que padrões atuais de estruturação genética de populações de peixes de água doce ao longo de drenagens do Sudeste do Brasil podem ser associados a dois eventos principais: (1) paleodrenagens e (2) capturas fluviais. O primeiro deles, que também foi o foco principal do trabalho destes autores, está associado às flutuações do nível do mar, que teriam moldado principalmente a estruturação genética de populações ao longo de bacias costeiras que drenam a planície litorânea. Estas bacias, que, hoje, são completamente isoladas entre si, teriam sido conectadas através de paleodrenagens existentes principalmente durante o Último Máximo Glacial (Pleistoceno) e estas paleoconexões seriam responsáveis, em maior ou menor escala, pela estruturação genética observada. Thomaz *et al.* (2015b) utilizaram como modelo de estudo uma espécie da família Characidae, *Hollandichthys multifasciatus* (Eigenmann & Norris), mas a maioria dos resultados encontrados no Capítulo 2 desta tese em relação a *Mimagoniates microlepis* concorda com a hipótese de paleodrenagens proposta por eles. Já em relação às capturas fluviais, Thomaz *et al.* (2015b) sugerem que estes

eventos tenham tido papel mais significativo como mecanismo responsável pela variação da estruturação genética populacional em espécies de peixes que ocorrem em “bacias do interior”, como é o caso de *G. melanopleura*. O evento de captura fluvial corresponde ao desvio natural das águas de uma bacia hidrográfica para outra, promovendo a expansão de uma drenagem em detrimento da vizinha (Small, 1977). Este fenômeno representa um importante processo no desenvolvimento das bacias hidrográficas e também da ictiofauna que as compõem, uma vez que, por estarem restritos aos corpos d’água após sua formação, os peixes de água doce dependem da conexão direta entre as bacias para aumentar sua dispersão (Vari, 1988; Hischmann *et al.*, 2015).

A ocorrência de diversas capturas fluviais já foi documentada/proposta nas bacias que drenam a parte leste do Brasil, especificamente na região do escudo cristalino brasileiro (*e.g.*, Ab’Saber, 1957; Malabarba, 1998; Saadi, 1998; Costa, 2001; Ribeiro, 2006; Menezes *et al.*, 2008; Buckup, 2011; Lima & Ribeiro, 2011), sendo a captura do rio Guaratuba uma das mais discutidas (*e.g.*, Oliveira, 2003, 2010; Riccomini *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2006; Oliveira & Neto, 2007; Souza, 2015). As cabeceiras do Guaratuba drenam a Estação Biológica de Boracéia (EBB), cuja área atua como um divisor de águas entre esta bacia e a bacia do rio Claro, localizada mais ao norte e que drena para o lado diametralmente oposto, até desembocar no Alto Tietê (Oliveira & Neto, 2007). Ribeiro *et al.* (2006) analisaram a ictiofauna da EBB e discutiram extensivamente o compartilhamento de espécies de peixes entre as bacias do Alto Tietê e Guaratuba, sendo que uma das espécies utilizadas como exemplo nesta discussão foi *G. melanopleura* (na época, *G. melanogenys*). Segundo estes autores, evidências biológicas (*i.e.*, compartilhamento de fauna) e geomorfológicas indicam que o rio Guaratuba, apesar de representar hoje uma bacia costeira independente, é um antigo afluente da bacia do Alto Tietê, que teve seu curso desviado em direção ao litoral como resultado de um fenômeno de captura fluvial. Diversos autores (*e.g.*, Oliveira & Neto, 2007; Oliveira, 2010) estudaram a evolução do relevo na Serra do Mar nesta região e apresentaram, com riqueza de detalhes, evidências geomorfológicas que corroboram a hipótese de paleoconexão entre o rio Guaratuba e a bacia do Paraná. Segundo Oliveira & Neto (2007) e Oliveira (2010), o rio Guaratuba, cujo curso pretérito dirigia-se para o rio Claro, afluente do Tietê, representa uma típica captura fluvial por recuo de cabeceiras como consequência da erosão regressiva da escarpa Serra do Mar (ver Fig. 1, em ‘Anexos’). Diz-se que ocorreu “captura fluvial por recuo de cabeceiras” quando dois rios adjacentes estão localizados em altitudes distintas e os tributários do curso mais baixo provocam a erosão regressiva de suas cabeceiras, atravessando o interflúvio e capturando o curso de água localizado em nível mais alto (Oliveira, 2010). Evidências desta captura podem

ser facilmente observadas hoje (Ribeiro *et al.*, 2006), tais como: (1) a mudança brusca na direção do fluxo de drenagem, que passa, repentinamente, de Nordeste-Sudoeste para Norte-Sul, cortando os alinhamentos NE-SW das rochas, no cotovelo de captura (i.e., uma mudança abrupta no curso de um rio em uma curva de 90° no local da captura), próximo à escarpa; (2) um vale seco próximo ao cotovelo de captura (*windgap*), correspondendo a um terraço com seixos do antigo leito do rio Guaratuba, anterior à captura; e (3) o nível de base local do rio Guaratuba mais baixo do que o do rio Claro no Planalto (Oliveira & Neto, 2007; Oliveira, 2010). Sobre o *windgap*, é interessante mencionar que apenas a presença de um vale atualmente seco não é evidência de captura, mas a presença de cascalhos no seu vale, e estes foram encontrados no antigo leito do Guaratuba (Oliveira & Neto, 2007). Ainda de acordo com Ribeiro *et al.* (2006), a captura do Guaratuba pode ser interpretada como uma resposta às últimas fases de reativação tectônica do *Rift* Continental do Sudeste do Brasil (RCSB). O RCSB, de idade paleógena, é uma depressão alongada e deprimida com pouco mais de 900 km de extensão, desenvolvida entre os estados do Paraná e Rio de Janeiro (Riccomini *et al.*, 2004). Segundo estes autores, o RCSB sofreu quatro eventos principais de deformação estrutural, responsáveis pelas reativações tectônicas ao longo das falhas pré-existentes, e com as seguintes datações estimadas: o primeiro teria ocorrido no Mioceno, o segundo entre o Neógeno-Quaternário, o terceiro no Pleistoceno tardio-Holoceno e o quarto e último no Holoceno. Ribeiro *et al.* (2006) propõem que a captura do Guaratuba tenha ocorrido no Pleistoceno-Holoceno, em decorrência da terceira fase de deformação estrutural do RCSB. A hipótese destes autores é embasada em dois fatos, que sugerem datação recente para este evento: (1) os efeitos da captura ainda são reconhecíveis na paisagem e (2) todas as espécies de peixes que ocorrem no alto rio Guaratuba também ocorrem no Alto Tietê, mas quase nenhuma delas ocorre no baixo curso do Guaratuba. Anos mais tarde, Souza (2015), tendo como base o estudo do relevo, também sugere idade quaternária para esta captura. A estimativa de tempo de divergência médio (i.e., 1,4 m.a.) entre as populações de *G. melanopleura* do (Alto Tietê, Itanhaém) e Guaratuba, obtida no presente estudo com base na matriz do gene COI, concordam com a datação proposta por estes autores.

O caso de captura do rio Guaratuba é apenas um exemplo de um fenômeno que, provavelmente, ocorreu repetidas vezes durante a história geológica da margem continental passiva da América do Sul, especialmente na parte leste do escudo cristalino brasileiro, uma área de topografia complexa, sujeita a uma série de reativações tectônicas ao longo do tempo geológico (Ribeiro, 2006; Ribeiro *et al.*, 2006). Após uma análise combinada de informações biológicas e geológicas, similar à realizada por Ribeiro *et al.* (2006) na bacia do rio Guaratuba, é

possível perceber que um outro exemplo de captura fluvial ocorrida na região que diz respeito à bacia do rio Capivari, conforme já proposto por Ab'Saber (2007). A drenagem do rio Capivari está localizada na APA Capivari-Monos, no município de São Paulo. Esta APA ocupa uma região montanhosa, onde estão localizadas as nascentes de quatro sub-bacias isoladas entre si: a primeira faz parte das cabeceiras do rio Embu-Guaçu, que corre para o interior em direção ao Alto Tietê e as outras três fazem parte das cabeceiras da bacia do rio Itanhaém e formam os rios Itariru, Mambú e Capavari/Monos (formadores do rio Branco), descendo a vertente oriental da Serra do Mar em direção à planície costeira (Nogueira, 2001). Um fato que chama atenção, associado ao relevo e à hidrografia da APA Capivari-Monos, diz respeito ao curso do rio Capivari (Jacintho, 2003). Segundo Ab'Saber (2007), o alto curso deste rio possui um traçado bastante complexo, que representa uma “das mais berrantes e importantes anomalias de drenagem” presentes na vertente atlântica paulista da Serra do Mar. O rio Capivari nasce em uma região colinosa, flui no sentido Sul-Norte na direção do rio Tietê, quase em paralelo com o rio Embu-Guaçu; depois converge, repentinamente, 130° a oeste na região do divisor de águas com esta bacia (onde está localizado o cotovelo de captura) e, então, passa a correr para um relevo de morros, recebendo inúmeros afluentes de pequeno porte e com a formação de corredeiras. Neste trecho, o rio apresenta traçado sinuoso, correndo no sentido Oeste-Leste, até se juntar com o rio dos Monos, quando converge para o sul e verte pela escarpa da Serra do Mar, para desaguar no rio Branco, já no município de Itanhaém (Ab'Saber, 2007; Jacintho, 2003). Assim, o traço complexo do rio Capivari, especialmente no seu alto curso (ver Fig. 2, em ‘Anexos’), indica que este rio (ou, pelo menos, parte dele) representa um antigo tributário do rio Tietê, que mudou seu curso em direção ao litoral em função de um evento de captura de cabeceira. Podem ser consideradas como evidências geomorfológicas desta captura, por exemplo, a mudança abrupta na direção do fluxo do rio Capivari, inclusive com a formação de um cotovelo de captura, o desnível entre esta bacia e o rio Embu-Guaçu localizado exatamente no divisor de águas, além da direção de fluxo das cabeceiras do rio Capivari, que é Sul-Norte, exatamente o oposto daquele apresentado pelo rio Itanhaém na área de planície, que é Norte-Sul (Ab'Saber, 2007). O compartilhamento de inúmeras espécies de peixes de água doce entre as bacias dos rios Capivari e Alto Tietê pode representar evidências biológicas desta captura, conforme sugerido por Ribeiro *et al.* (2006) no caso do rio Guaratuba. Além de *G. melanopleura*, outras espécies, apesar de apresentarem distribuição reconhecidamente restrita, ocorrem tanto na bacia do rio Capivari quanto no Alto Tietê, como por exemplo, *Pseudotocinclus tietensis* (Iheringi) (*e.g.*, MZUSP 108578; MZUSP 108642), *Trichomycterus paolence* (Eigenmann) (*e.g.*, MZUSP 108622; MZUSP 108930), *Atlantirivulus santensis* (Köhler)

(e.g., MZUSP 108627; MZUSP 108647) e *Astyanax bockmanni* Vari & Castro (e.g., MZUSP 108591; MZUSP 108649). Segundo Ab'Saber (2007), é provável que a captura fluvial do Capivari tenha ocorrido no Pleistoceno, uma vez que, durante o Plioceno (Neógeno) e parte do Quaternário antigo, esta drenagem ainda corria para o Alto Tietê. As estimativas de tempo de divergência entre as populações de *G. melanopleura* do rio Capivari (Itanhaém) e Alto Tietê, obtidas no presente estudo com base na matriz do gene COI e datadas do final do Pleistoceno, quase Holoceno, concordam com a datação proposta por este autor. Estas datações, aliadas ao fato de ser possível reconhecer na paisagem atual os efeitos desta captura e o compartilhamento da ictiofauna, também indicam que este fenômeno de captura foi relativamente recente, podendo também representar uma consequência das últimas deformações estruturais do RSCB. Aqui, é importante mencionar que, segundo Jacintho (2003), características do relevo da região drenada pelo rio Capivari, associadas à mudança abrupta do curso deste rio, sugerem uma atividade neotectônica atuante, apesar de pouco estudada, na área.

Menezes *et al.* (2008) também associam a ocorrência de *G. melanopleura* no alto curso dos rios Ribeira de Iguape e Itatinga ao fenômeno de captura de cabeceiras. Segundo estes autores, trechos do alto curso destes rios são antigos afluentes da bacia do rio Paraná, para onde corriam antes das reativações tectônicas do RSCB, que causaram rearranjos de várias drenagens na região. Apesar dos esforços de coleta, nenhuma amostra de tecido de *G. melanopleura* foi obtida, de maneira que não foi possível discutir tal hipótese no presente estudo.

### 5.1. Variação morfológica em *Glandulocauda melanopleura*

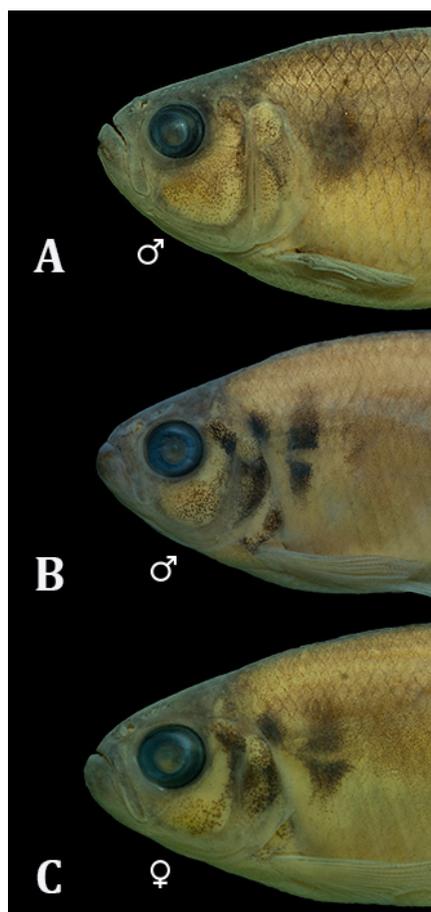
Em seu trabalho de revisão e filogenia morfológica de Glandulocaudini (na época, Glandulocaudinae), Menezes & Weitzman (2009) analisaram principalmente espécimes de *Glandulocauda melanopleura* da bacia do Alto Tietê (localidade tipo e adjacências), mas também incluíram os três únicos exemplares do Ribeira de Iguape (MZUSP 79429) e 31 exemplares coletados na bacia do rio Guaratuba, na Estação Biológica de Boracéia, sendo dez deles do lote MZUSP 84412 e 21 do MZUSP 48511, este último na localidade “córrego Mutuca”. Aqui, é importante mencionar que os dados de GPS referentes à coleta neste córrego (23°39'60"S; 45°52'60"O) foram plotados no mapa e não há dúvidas de que ele faça parte da bacia do rio Guaratuba. Esta observação é válida, pois tanto na etiqueta do lote quanto no trabalho de Menezes & Weitzman (2009: 315-316) não há indicação da bacia a qual o “córrego Mutuca” pertence, e, na EBB, há um córrego homônimo, mas que é afluente da bacia do rio

Claro (Alto Tietê) (23°39'22"S; 45°50'49"O em Silva, 2005; ver também <http://sinbiota.biota.org.br/occurrence/17380/>).

Ao comparar os resultados obtidos no presente estudo com aqueles apresentados por Menezes & Weitzman (2009), algumas considerações em relação à variação morfológica da espécie se fazem pertinentes. Em primeiro lugar, estes autores chamaram atenção para o número reduzido de raios ramificados da nadadeira anal encontrado nos espécimes do rio Guaratuba e em quatro dos 59 indivíduos do Alto Tietê examinados (17-20 vs. 20-25 da maioria dos exemplares do Tietê). Os resultados obtidos no presente estudo indicam que, de fato, a grande maioria dos exemplares do Alto Tietê possui mais de 20 raios ramificados na nadadeira anal, assim como os três indivíduos do Ribeira de Iguape, enquanto que as populações do rio Guaratuba e Itatinga tendem a ter valores mais baixos (i.e., 16-20). A população do rio Itanhaém, no entanto, aparece como intermediária, com valores entre 16-22 (Fig. 5f). Sendo assim, quando todas as populações são analisadas, é possível observar um contínuo de variação, que dificulta a separação precisa entre elas com base neste caráter, ainda mais quando os *outliers* dos rios Alto Tietê e Guaratuba são considerados. Aqui, é importante lembrar que as análises moleculares indicaram que as populações dos rios Alto Tietê e Itanhaém representam a mesma linhagem, de maneira que se os espécimes destas localidades forem agrupados para comparação com aqueles do Guaratuba, a sobreposição de valores do número de raios ramificados da nadadeira anal é completa (16-25 vs. 16-20, respectivamente). Especificamente para os dez exemplares do rio Guaratuba do lote MZUSP 84412, Menezes & Weitzman (2009: 315) ainda pontuam que estes apresentam um número de fileira de escamas na série transversal e ao redor do pedúnculo caudal maior do que normalmente encontrado nos espécimes do Alto Tietê (16-17 vs. 13-16 e 18-20 vs. 17-19, respectivamente). Como recomendado por estes autores, no presente estudo, foi analisado um número maior de exemplares destas populações, especialmente do Guaratuba, e estes valores se mostraram completamente sobrepostos (Fig. 5e), com leve aumento na amplitude de variação destes caracteres na espécie (Tabela 6).

De uma forma geral, os dados merísticos, morfométricos e de colorido obtidos no presente estudo indicam sobreposição de valores e padrão entre as populações de toda a distribuição conhecida de *G. melanopleura*, o que não justifica o reconhecimento de mais de uma espécie em relação às diferentes populações analisadas. Entretanto, a análise de mais indivíduos e localidades, realizada no presente estudo, indicou maior amplitude de variação em outros caracteres merísticos da espécie além dos supracitados, que são discutidos a seguir.

Assim como os demais Glandulocaudini *sensu* Thomaz *et al.* (2015a), *G. melanopleura* apresenta linha lateral incompleta (Eigenmann, 1911; Menezes & Weitzman, 2009), que significa que nem todas as escamas associadas ao canal da linha lateral apresentam poros. Diferentemente das demais espécies da tribo, *G. melanopleura* apresenta uma grande amplitude de variação em relação ao número de escamas perfuradas da linha lateral (7-27 vs. 4-8 em *G. caerulea*, 1-7 em *Lophiobrycon weitzmani* e, no máximo, 5-10 entre as espécies de *Mimagoniates*) (Menezes & Weitzman, 2009). A população do rio Capivari, bacia do Itanhaém, no entanto, apresenta uma variação ainda maior desta característica, tanto em relação à amplitude quanto em relação à condição do caráter em si. Dos 19 exemplares analisados (MZUSP 106577, 108724, 108621 e 111017), cinco possuem mais do que 27 escamas perfuradas, três possuem padrão descontínuo de perfuração (i.e., blocos de escamas perfuradas intercalados com blocos de não perfuradas) e um exemplar possui linha lateral completa, condição nunca antes mencionada em Glandulocaudini. De acordo com Marinho *et al.* (2014), apesar da variação da condição “linha lateral completa ou incompleta” dentro da mesma espécie ser incomum e pouco documentada na família Characidae, há casos assim em espécies de *Hemigrammus* (e.g., *H. ataktos* Marinho, Dagosta, Birindelli; *H. barrigonae* Eigenmann & Henn), *Moenkahuia* (e.g., *M. celibela* Marinho & Langeani; *M. cotinho* Eigenmann) e também em *Odontostilbe dialeptura* Fink & Weitzman, por exemplo. Segundo Fink & Weitzman (1974), apesar de esta última espécie tender a ter linha lateral incompleta, em algumas populações, há indivíduos que possuem a linha lateral completamente ou quase completamente perfurada, além daqueles que têm a linha incompleta, exatamente como acontece com *G. melanopleura*. Com relação ao número de escamas da série longitudinal também houve aumento da amplitude de variação, de 37-42 para 32-52. Além dos caracteres merísticos, alguns indivíduos da população do rio Capivari apresentam variação de colorido relacionada ao dimorfismo sexual diferente da descrita em *G. melanopleura* por Menezes & Weitzman (2009). Segundo estes autores, os machos de *G. melanopleura* apresentam mancha umeral mais escura do que as fêmeas e também metade inferior do opérculo com maior concentração de cromatóforos escuros (ver Menezes & Weitzman, 2009: Figs. 11 e 12, página 310). No rio Capivari, entretanto, foram coletadas fêmeas com o colorido esperado de machos e vice-versa, como apresentado na Fig. 8.

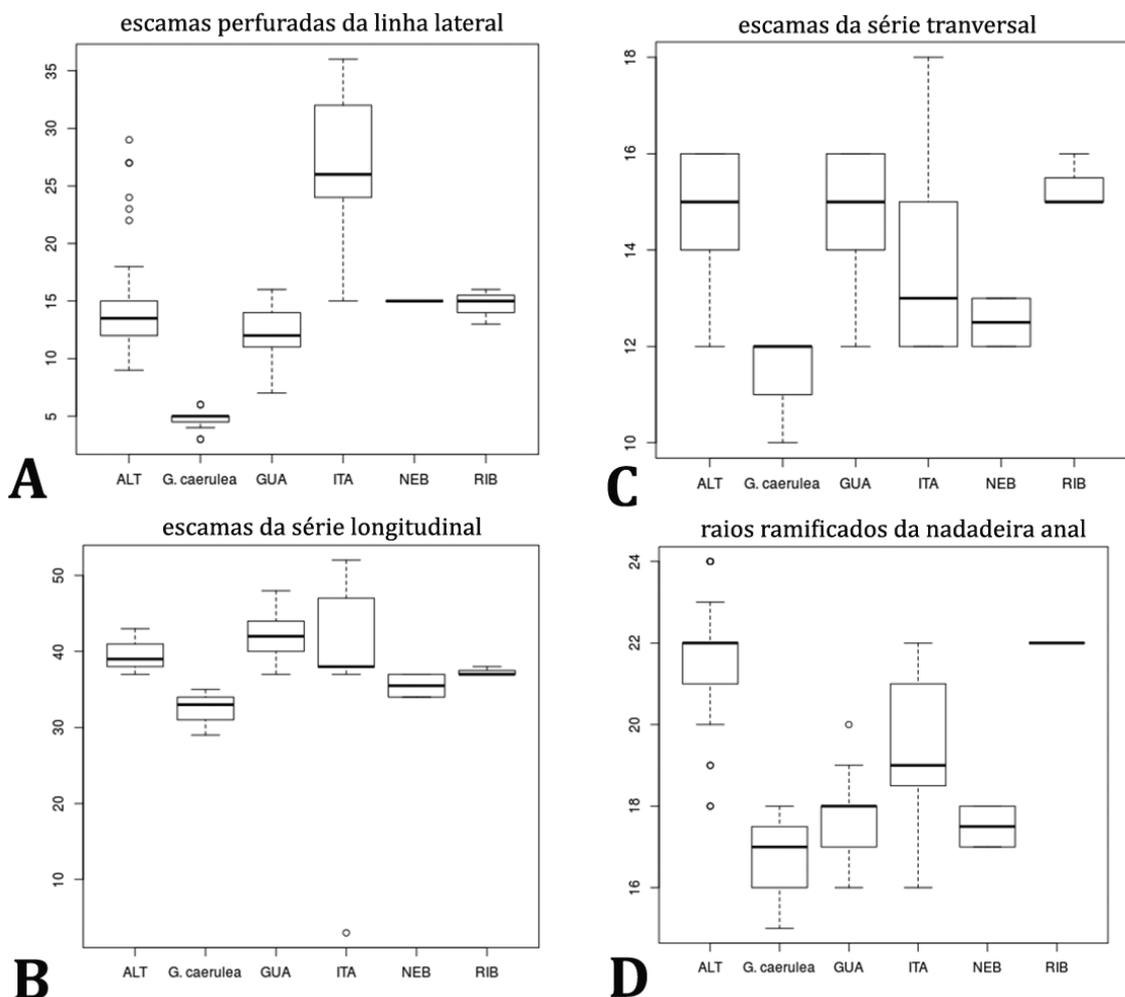


**Figura 8.** Variação no padrão de colorido da região humeral e opercular de *Glandulocauda melanopleura* da bacia do rio Itanhaém, MZUSP 111017 em machos (A e B, 55,8 mm CP e 44,5 mm CP, respectivamente) e fêmea (C, 42,1 mm CP).

Os resultados obtidos no presente estudo, portanto, incluindo aqui os das análises moleculares e morfológicas, indicam que, apesar das diferentes populações alopátricas de *G. melanopleura*, apresentarem estruturação genética e variação morfológica, nenhuma destas duas foi suficientemente grande para separá-las em espécies distintas. Estes resultados corroboram a hipótese de Menezes & Weitzman (2009) de que, apesar das variações encontradas, a sobreposição de valores dos caracteres merísticos indica que os espécimes das bacias dos rios Alto Tietê e Guaratuba, analisados por eles, são co-específicos.

Apesar dos resultados das análises filogenéticas realizadas no presente estudo não corroborarem o monofiletismo de *Glandulocauda*, até que análises moleculares e morfológicas adicionais sejam feitas, os nomes *G. melanopleura* e *G. caerulea* serão mantidos. Segundo Menezes & Weitzman (2009), *Glandulocauda melanopleura* difere de *G. caerulea*, principalmente, por apresentar 20-24 raios ramificados na nadadeira anal (vs. 15-18), 13-16 fileiras de escamas na linha transversal (vs. 11-13), 7-27 escamas perfuradas na linha lateral (vs. 4-8) e 37-42 escamas totais na linha lateral (vs. 31-35). Com os dados recentes, obtidos no

presente estudo, estas contagens passam a ter uma pequena sobreposição, mas, ainda assim, é possível perceber uma separação entre os valores (Fig. 9), indicando que as diferenças continuam sendo significativas. Além disso, *G. melanopleura* e *G. caerulea* são facilmente distinguíveis por outras características tais como tamanho e posição da maxila inferior em relação a superior (relativamente maior e protraída para cima em *G. melanopleura* e relativamente reta, do mesmo tamanho ou menor em *G. caerulea*, ver Fig. 10) e também pelo padrão de colorido em vida dos machos (no geral, amarronzado/cobreado/amarelado em *G. melanopleura* e predominantemente azulado em *G. caerulea*, Menezes & Weitzman, 2009: 323).



**Figura 9.** Gráficos *BoxPlot*, indicando a variação de alguns caracteres merísticos entre as populações de *Glandulocauda melanopleura* analisadas no presente estudo (ALT, Alto Tietê; GUA, Guaratuba; ITA, Itanhaém; NEB, Itatinga; e RIB, Ribeira de Iguape) e *Glandulocauda caerulea*.



**Figura 10.** *Glandulocauda caerulea*, exemplar fixado, MZUSP 97663, macho, 40,8 mm CP, bacia do rio Iguaçu, Paraná. Foto: F. P. Dagosta.

## 6. Conclusões

No presente estudo, foram utilizadas fontes de dados e abordagens metodológicas variadas para a melhor compreensão da variação populacional e história evolutiva de *Glandulocauda melanopleura*, uma espécie de peixe de água doce endêmica de riachos que drenam áreas de elevada altitude no escudo cristalino brasileiro, na vertente leste da Serra do Mar, em São Paulo. As análises filogenéticas (IB e MV) baseadas no mtDNA corroboraram o monofiletismo de *G. melanopleura*. Já as análises de identificação molecular de espécies (GMYC e *DNA barcoding*), baseadas no gene mitocondrial COI, indicaram a existência de duas linhagens distintas, uma incluindo indivíduos do (Alto Tietê, Itanhaém) e outra representada pela população de Guaratuba. No entanto, as análises morfológicas realizadas, que incluíram espécimes destas linhagens e das demais populações conhecidas de *G. melanopleura*, não corroboraram estes resultados, com sobreposição de valores que não justificaria a separação das linhagens em espécies distintas. Assim, todas as populações analisadas foram mantidas sob o nome *G. melanopleura*, que passou a ser uma espécie com maior amplitude de variação de alguns caracteres merísticos (*e.g.*, número e escamas perfuradas na linha lateral, na série longitudinal, ao redor do pedúnculo caudal, número de raios ramificados da nadadeira anal) e também com distribuição geográfica mais ampla do que proposto anteriormente, incluindo a bacia do Alto Tietê, e parte das cabeceiras das drenagens costeiras de Itanhaém, Itapanhaú, Guaratuba e Ribeira de Iguape, em São Paulo. Em função das divergências genéticas

encontradas nas populações analisadas, sugere-se, no entanto, que a conservação da espécie seja pensada em nível regional, visando a manutenção de toda a variabilidade genética encontrada. As redes de haplótipo indicaram estruturação ainda maior dentro da espécie, já que nenhuma das populações analisadas compartilha haplótipo entre si, o que pode estar associado ao completo isolamento destas. As informações de demografia histórica indicam que, muito provavelmente, a bacia do Alto Tietê é o local de origem de *G. melanopleura*, conforme já sugerido na literatura por outros autores. Os dados de distribuição de *G. melanopleura* aliados ao tempo de divergência estimado com relação às diferentes populações analisadas e às informações geomorfológicas disponíveis, indicam que o atual padrão de distribuição da espécie é reflexo de eventos de capturas fluviais relativamente recentes, associados principalmente ao começo do Quaternário e às reativações tectônicas do *Rift* Continental do Sudeste do Brasil.

## 7. Referências Bibliográficas

- Ab'Saber, A. N. 1957. O problema das conexões antigas e da separação da drenagem do Paraíba e Tietê. **Boletim Paulista de Geografia**, 26: 38-49.
- Ab'saber, A. N. 2007. **Geomorfologia do sítio urbano de São Paulo**. São Paulo, Ateliê Editorial, 349p.
- April, J., R. L. Mayden, R. H. Hanner, L. Bernatchez. 2011. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. **PNAS**, 108(26): 10602-10607.
- Avice, J. C. 2000. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge, Harvard University Press, 464p.
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Jr, Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 489-522.
- Bandelt, H. J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16(1): 37-48.
- Barracough, T. G., M. Hughes, N. Ashford-Hodges & T. Fujisawa. 2009. Inferring evolutionarily significant units of bacterial diversity from broad environmental surveys of single-locus data. **Biology Letters**, 5: 425-428.

- Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. K. L. Ng, R. Meier, K. Winkler, K. K., Ingram & I. Das. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, 22, 148-155.
- Buckup, P. A. 2011. The Eastern Brazilian Shield. *In*: Albert, J. S. & R. E. Reis (Eds.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley, University of California Press, cap. 12, p. 203-210
- Correa, M. S. 2006. **Parque das Neblinas: Mesmos Caminhos, Novos Rumos**. São Paulo, Ecofuturo, 148p.
- Costa, W. J. E. M. 2001. The neotropical annual fish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, 12(4): 333-383.
- Costa-Silva, G. J., M. S. Rodriguez, F. F. Roxo, F. Foresti & C. Oliveira. 2015. Using Different Methods to Access the Difficult Task of Delimiting Species in a Complex Neotropical Hyperdiverse Group. **PLoS ONE**, 10(9): e0135075. doi:10.1371/journal.pone.0135075.
- Eigenmann, C. H. 1911. III. New characins in the collections of the Carnegie Museum. **Annals of the Carnegie Museum**, 8(1): 164-181.
- Ellis, M. D. 1911. On the species of *Hasemanina*, *Hyphessobrycon*, and *Hemigrammus* collected by J. D. Haseman for the Carnegie Museum. **Annals of the Carnegie Museum**, 8(1): 148-163.
- 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.
- Ferreira, C. P. 2007. **Ictiofauna de riachos na planície costeira da bacia do rio Itanhaém, litoral sul de São Paulo**. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Zoologia) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Fink, W. L. & S. H. Weitzman. 1974. The so-called cheirodontin fishes of Central America with description of two new species (Pisces, Characidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 172: 1-46.
- Fontaneto, D., E. Herniou, C. Boschetti, M. Caprioli, G. Melone, C. Ricci & T. G. Barraclough. 2007. Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. **PLoS Biology**, 5:e87. PMID: 17373857.
- Forest, F. 2009. Calibrating the Tree of Life: fossils, molecules and evolutionary timescales. **Annals of Botany**, 104: 789-794.

- Frankham, R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe. 2002. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge, Cambridge University Press, 607p.
- Fricke, R. & Eschmeyer, W. N. 2016. **Guide to fish collections**. Disponível em <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/collections.asp>. Acesso em 02 abr. 2016.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, 147: 915-925.
- 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(5): 707-724.
- Géry, J. 1964. *Glandulocauda terofali* sp. nov., un nouveau Poisson characoïde de la République Argentine, avec une note sur la “glande” caudale des Stevardiidi. **Opuscula Zoologica**, 78: 1-12.
- Grant, W. S. & B. W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of Heredity**, 89: 415-426.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society**, 270: 313-322.
- Hirschmann, A., L. R. Malabarba, A. T. Thomaz & N. J. R. Fagundes. 2015. Riverine habitat specificity constrains dispersion in a Neotropical fish (Characidae) along Southern Brazilian drainages. **Zoologica Scripta**, 44(4): 374-382.
- Jacinto, L. R. de C. 2003. **Geoprocessamento e sensoriamento remoto como ferramentas na gestão ambiental de Unidades de Conservação: o caso da Área de Proteção Ambiental (APA) do Capivari-Monos, São Paulo – SP**. 121f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Kekkonen, M. & P. D. N. Hebert. 2014. DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows. **Molecular ecology resources**, 14: 706-15.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25: 145-1452.
- Lima, F. C. T. & A. C. Ribeiro. 2011. Continental-Scale Tectonic Controls of Biogeography and Ecology. *In*: Albert, J. S. & R. E. Reis (Eds.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley, University of California Press, cap. 9, p. 145-184.

- Mabragaña, E., J. M. Díaz de Astarloa, R. Hanner, J. Zhang & M. González Castro. 2011. DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. *PLoS ONE*, 6(12): e28655. doi:10.1371/journal.pone.0028655.
- Malabarba, M. C. 1998. Phylogeny of fossil Characiformes and paleobiogeography of the Tremembé Formation, São Paulo, Brazil. *In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. S. Lucena & C. S. Lucena (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, p. 69-84.
- Marinho, M. M. F., F. C. P. Dagosta & J. L. O Birindelli. 2014. *Hemigrammus ataktos*: a new species from the rio Tocantins basin, central Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 12(2): 257-26.
- Martins, F. M. & Domingues, M. V. 2011. Filogeografia. *In: Carvalho, C. J. B. & E. A. B. Almeida. Biogeografia da América do Sul: padrões e processos*. São Paulo, Roca, cap. 8, p. 137-150.
- Menezes, N. A. 2007. Família Characidae: Glandulocaudinae. *In: Buckup, P. A., N. A. Menezes & M. S. Ghazzi (Eds.) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio De Janeiro, Museu Nacional, p. 38-39.
- Menezes, N. A. & F. C. T. Lima. 2008. *Glandulocauda melanogenys* Eigenmann, 1911. *In: Machado, A. B. M., G. M. Drumond & A. P. Paglia (Eds.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Brasília, MMA; Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, p. 62-63.
- Menezes, N. A. & S. H. Weitzman. 1990. Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the glandulocaudin fishes of Brazil and Paraguay. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 103(2): 380-426.
- Menezes, N. A. & S. H. Weitzman. 2009. Systematics of the Neotropical fish subfamily Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 7(3): 295-370.
- Menezes, N. A., S. H. Weitzman, O. T. Oyakawa, F. C. T. de Lima, R. M. C. Castro & M. J. Weitzman. 2007. *Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar de espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais*. São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 408p.
- Menezes, N. A., A. C. Ribeiro, S. H. Weitzman & R. A. Torres. 2008. Biogeography of the Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. *Zootaxa*, 1726: 33-48.

- Moore, W. S. 1995. Inferring Phylogenies from mtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees. *Evolution*, 49(4): 718-726.
- Nogueira, S. M. B. 2001. **Análise da suscetibilidade ambiental e diretrizes para o zoneamento do Núcleo Curucutu do Parque Estadual da Serra do Mar (SP)**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Nylander, J. A. A. 2004. **MrModeltest v2**. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oliveira, D. de. 2003. **A captura do Alto Rio Guaratuba: uma proposta metodológica para o estudo da evolução do relevo na Serra do Mar, Boracéia-SP**. 105f. Tese (Doutorado) – Departamento de Geografia-FFLCH-USP, São Paulo.
- Oliveira, D. de. 2010. Capturas fluviais como evidências da evolução do relevo: uma revisão bibliográfica. *Revista do Departamento de Geografia*, 20: 37-50.
- Oliveira, D. de & J. P. Q. Neto. 2007. Estudo da evolução do relevo na Serra do Mar no Estado de São Paulo a partir de um caso de captura fluvial. *Geosp*, 22: 73-88.
- Oliveira, C., G. S. Avelino, K. T. Abe, T. C. Mariguela, R. C. Benine, G. Ortí, R. P. Vari & R. M. Corrêa e Castro. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 2011: 1-25.
- Pereira, L. H. G., R. Hanner, F. Foresti & C. Oliveira. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetic*, 14: 20.
- Pons, J., T. G. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D. P. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W. D. Sumlin & A. P. Vogler. 2006. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology*, 55(4): 595-609.
- R Development Core Team. 2009. **Writing R Extensions**. Manual included with R version 2.10.0.
- Rambaut, A. 2009. **FigTree, version 1.3.1**. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em 10 dez. 2015.
- Rambaut, A. & A. J. Drummond. 2009. **Tracer, version 1.5**. Disponível em: [http://beast.bio.ed.ac.uk/Main\\_Page](http://beast.bio.ed.ac.uk/Main_Page). Acesso em 16 dez. 2015.
- Ramos-Onsins, S. E. & J. Rosas. 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2092-2100.

- 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**, 196: 1-11.
- Ribeiro, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, 4(2): 225-246.
- Ribeiro, A. C., F. C. T. Lima, C. Ricomini & N. A. Menezes. 2006. Fishes of the Atlantic Rainforest of Boracéia: testimony of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, 17(2): 625-630.
- Riccomini, C., L. G. Sant'Anna & A. L. Ferrari. 2004. Evolução geológica do Rift Continental do Sudeste do Brasil. *In*: V. Mantesso-Neto, A. Bartorelli, C. D. R. Carneiro & B. B. Brito-Neves (Eds.). **Geologia do continente Sul-Americano: evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida**. São Paulo, Editora Beca, p. 383-405.
- Rosa, R. S. & F. C. T. Lima. 2008. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. *In*: Machado, A. B. M., G. M. Drummond & A. P. Paglia (Eds.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**, Brasília, Ministério do Meio Ambiente, p. 9-275.
- Roxo, F. F., L. E. Ochoa, G. J. Costa-Silva & C. Oliveira. 2015. Species delimitation in *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) using morphologic and genetic approaches. **DNA Barcodes**, 3: 110-117.
- Saadi, A. 1998. A geomorfologia da Serra do Espinhaço em Minas Gerais e de suas margens. **Geonomos**, 3(1): 41-63.
- Serra, J. P., F. R. Carvalho & F. Langeani. 2007. Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo State: composition and biogeography. **Biota Neotropica**, 7(1): 81-86.
- Silva, R. M. L. da. 2005. **Estudo comparativo da distribuição de ninfas de Ephemeroptera (Insecta) em diferentes mesohabitats e análise do conteúdo estomacal em Leptophlebiidae**. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Small, R. J. 1977. **The Study of Landforms: a Textbook of Geomorphology**. Cambridge, Cambridge University Press, 486p.

- Souza, C. R. de G. 2015. The Bertioga Coastal Plain: An Example of Morphometric Evolution. *In: Vieira, B. C., A. A. R. Salgado & L. J. C. Santos (Eds.). Landscapes and Landforms of Brazil.* New York, Springer Verlag, cap. 11, p. 115-134.
- Spellman, G. M. & J. Klicka. 2006. Testing hypotheses of Pleistocene population history using coalescent simulations: phylogeography of the pygmy nuthatch (*Sitta pygmaea*). **Proceedings of the Royal Society of London B**, 273: 3057-3063.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, 123: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123: 585-595.
- Talavera, G., V. Dincă & R. Vila. 2013. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. **Methods in Ecology and Evolution**, 4: 1101-1110.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28(10): 2731-2739.
- Thomaz, A. T., D. Arcila, G. Ortí & L. R. Malabarba. 2015a. Molecular phylogeny of the subfamily Stevardiinae Gill, 1858 (Characiformes: Characidae): classification and the evolution of reproductive traits. **BMC Evolutionary Biology**, 15: 1-25.
- Thomaz, A. T., L. R. Malabarba, S. L. Bonatto & L. L. Knowles. 2015b. Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, 1-13.
- Valdez-Moreno M., N. V. Ivanova, M. Elías-Gutiérrez, S. Contreras-Balderas, P. D. N. Hebert. 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. **Journal of Fish Biology**, 74: 377-402.
- Vari, R. P. 1988. The Curimatidae, a Lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes): distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. *In: Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R. (Eds.). Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns.* Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 343-377.
- Xia, X. & P. Lemey. 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. *In: Lemey, P., M. Salemi, Vandamme, A. M. The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny.* Cambridge, University Press, p.615-630.
- Xia, X., Z. Xie, M. Salemi, L. Chen & Y. Wang. 2003. An index of substitution saturation and its application. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 26: 1-7.

- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last & P. D. N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 360: 1847-1857.
- Ward, R. D., R. Hanner & P. D. N. Hebert. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, 74, 329–356.
- Weitzman, S. H. 2003. Subfamily Glandulocaudinae (Characins, tetras). *In*: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, p. 222-230.
- Weitzman, S. H. & S. V. Fink. 1985. Xenurobryconin phylogeny and putative pheromone pumps in glandulocaudine fishes (Teleostei: Characidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 421: 1-121.
- Weitzman, S. H., N. A. Menezes & M. J. Weitzman. 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. *In*: Vanzolini, P. E. & W. R. Heyer (Eds.). **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, p. 379-427.

## 8. Apêndice

Lista do material examinado de *Glandulocauda melanopleura* e *G. caerulea* no presente estudo, organizada por bacia e na sequência: abreviatura institucional com número de tombo de cada lote, número total de espécimes presente no lote, indicação de material diafanizado/corado (d&c) ou com tecido disponível (mol), seguido pela amplitude de variação do comprimento padrão dos exemplares (CP).

### *Glandulocauda melanopleura*

**Bacia do rio Alto Tietê:** LBP 4507, 10, 7 mol, 40,5-45,0 mm CP; MZUSP 26891, 3, 43,4-52,3 mm CP; MZUSP 28849, 10, 26,9-32,7 mm CP; MZUSP 35242, 8, 1 d&c, 33,8-39,1 mm CP; MZUSP 74333, 10, 1 d&c, 25,2-30,2 mm CP; MZUSP 86967, 3, 43,6-57,5 mm CP; MZUSP 86984, 2, 24,9-44,0 mm CP. **Bacia do rio Itanhaém:** MZUSP 108577, 2, 29,7-36,2 mm CP; MZUSP 108621, 8, 24,3-31,9 mm CP; MZUSP 108724, 1, 54,0 mm CP; MZUSP 111017, 22, 2 d&c, 10 mol, 14,5-57,4 mm CP. **Bacia do rio Guaratuba:** MZUSP 84412, 10, 19,2-37,2 mm CP; MZUSP 87567, 23, 18,2-36,1 mm CP; MZUSP 87571, 43, 1 d&c, 29,5-44,0 mm CP. MZUSP 115244, 20, 12 mol, 33,0-39,4 mm CP. **Bacia do rio Ribeira de Iguape:** MZUSP 79429, 3, 37,5-48,9 mm CP. **Bacia do rio Itatinga:** DZSJRP 6613, 2, 26,2-26,6 mm CP.

### *Glandulocauda caerulea*

**Bacia do rio Iguçu/Paraná:** MNRJ, 19537, 5, 34,4-40,8 mm CP; MZUSP 97663, 5, 21,9-40,8 mm CP; MZUSP 97664, 5, 26,6-41,8 mm CP; MZUSP 97665, 2, 30,1-46,5; MZUSP 97666, 3, 1 d&c, 34,3-38,7 mm CP; MZUSP 117479, 4, 4 mol, 28,9-34,1 mm CP.

## 9. Anexos

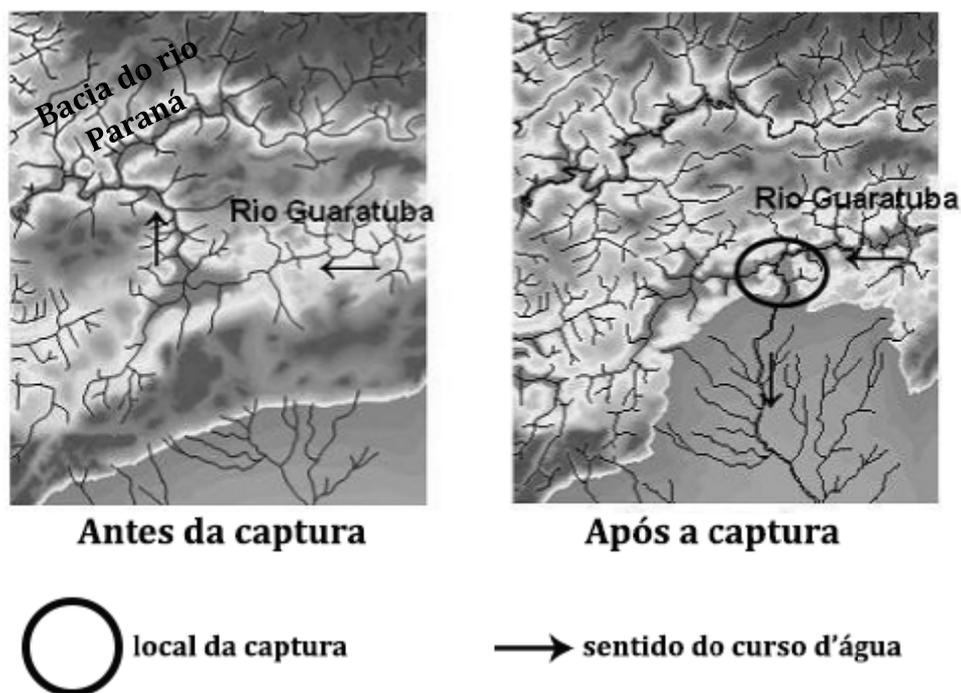


Figura 1. Cenário da captura fluvial do rio Guaratuba, no Estado de São Paulo. Imagem modificada de Oliveira (2003) e Oliveira (2010).

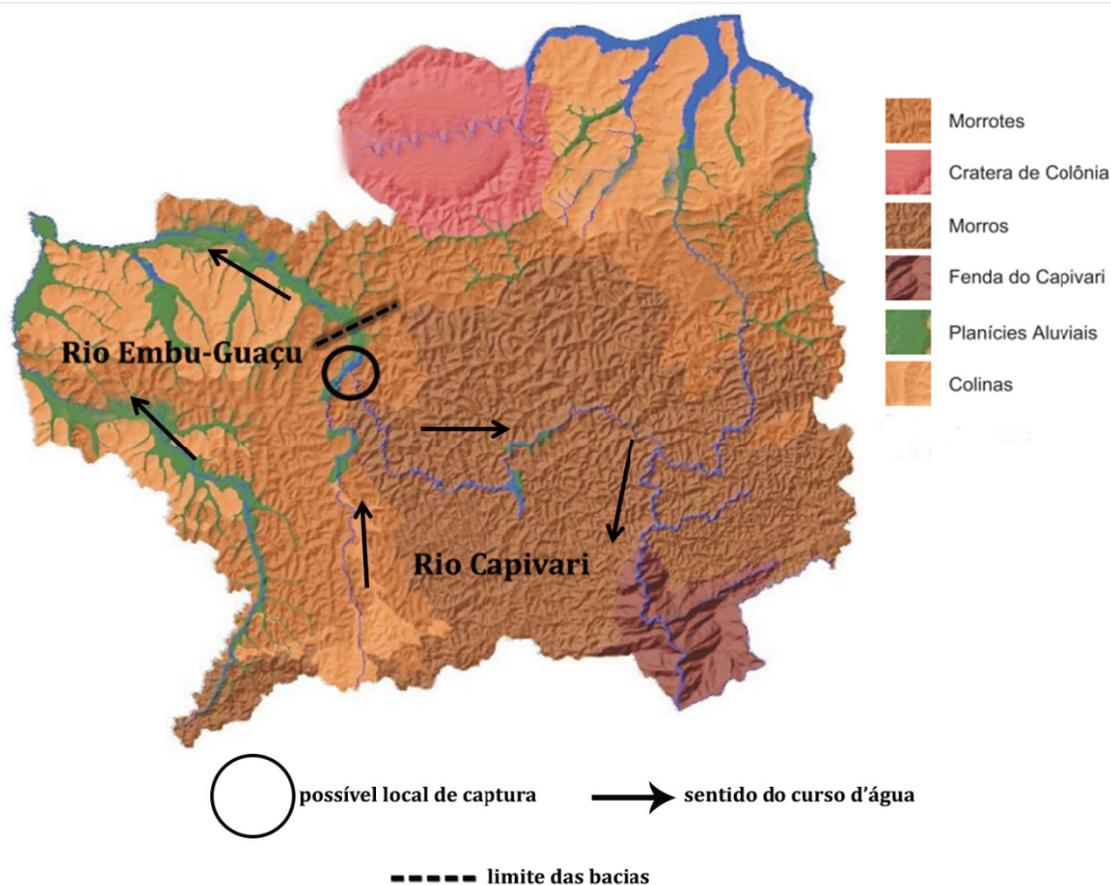


Figura 2. Cenário proposto para a captura fluvial do rio Capivari (bacia do rio Itanhaém), no Estado de São Paulo. Imagem: mapa da bacia do rio Capivari, na APA Capivari-Mono, modificado de Jacintho (2003).

