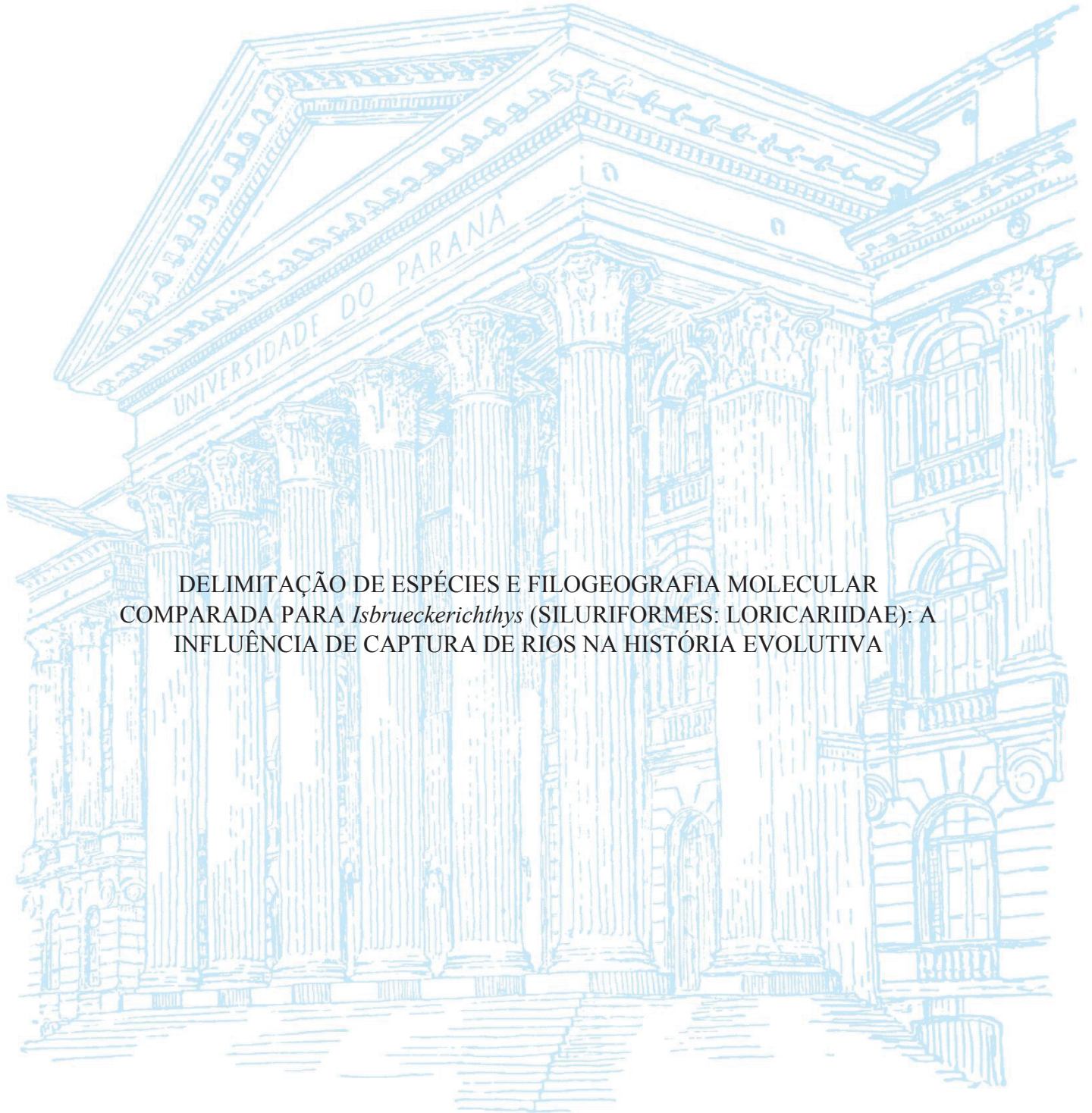


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL BONFIM DE ALMEIDA



DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E FILOGEOGRAFIA MOLECULAR  
COMPARADA PARA *Isbrueckerichthys* (SILURIFORMES: LORICARIIDAE): A  
INFLUÊNCIA DE CAPTURA DE RIOS NA HISTÓRIA EVOLUTIVA

CURITIBA

2019

RAFAEL BONFIM DE ALMEIDA

DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E FILOGEOGRAFIA MOLECULAR  
COMPARADA PARA *Isbrueckerichthys* (SILURIFORMES: LORICARIIDAE): A  
INFLUÊNCIA DE CAPTURA DE RIOS NA HISTÓRIA EVOLUTIVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Genética do setor de Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Almeida, Rafael Bonfim de.

Delimitação de espécies e filogeografia molecular comparada para *Isbrueckerichthys* (*Siluriformes: Loricariidae*): a influência dos eventos de captura de rios na história evolutiva. / Rafael Bonfim de Almeida. – Curitiba, 2019.

96 f. : il.

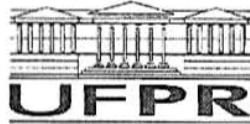
Orientador: Marcelo Ricardo Vicari.

Coorientador: Rodrigo Augusto Torres.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Biogeografia. 2. Peixe – Distribuição geográfica. 3. Peixe - Evolução. 4. Peixe - População. 5. Rios. 6. Biodiversidade. 7. Filogeografia. I. Título. II. Vicari, Marcelo Ricardo. III. Torres, Rodrigo Augusto. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 597.52



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -  
40001016006P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RAFAEL BONFIM DE ALMEIDA** intitulada: **Delimitação de espécies e filogeografia molecular comparada para *Isbrueckerichthys* (*Siluriformes: Loricariidae*): a influência dos eventos de captura de rios na história evolutiva.**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Março de 2019.

MARCELO RICARDO VICARI  
Presidente da Banca Examinadora

MICHELLE ORANE SCHEMBERGER  
Avaliador Externo (UEPG)

KALINE ZIEMNICZAK  
Avaliador Externo (UNESPAR)

ALAIN VICTOR DE BARROS BARBOZA  
Avaliador Externo (UEPG)

GUILHERME SCHNELL E SCHUHLI  
Avaliador Externo (Embrapa)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Kátia Maria Bonfim de Almeida, por todos os anos de apoio e incentivo, e por nunca ter desistido de mim. Ela é a responsável por eu ter chegado até aqui, e a pessoa em quem eu me inspiro, sempre.

À minha irmã, Laís Bonfim de Almeida, pelo companheirismo e cumplicidade de sempre, e também pela ajuda pra manter o caminho. Espero retribuir o incentivo na caminhada acadêmica que está começando a trilhar agora. Valeu, mana.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, por acreditar no projeto desde o piloto, pela orientação, pelas dicas, pelas parcerias nas coletas e churrascos. Alguém que considero não apenas como orientador, mas como amigo.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres pela co-orientação e pelas dicas valiosas e conversas no meio de congressos e cursos.

Ao Prof. Dr. Guilherme Schnell e Schühli, a quem eu devo muito da minha formação e interesse por essa área. Um amigo e mentor, que desde os estágios na graduação vem sempre sendo a quem eu recorro, e quem eu sempre sei que posso confiar. Espero ser um profissional tão brilhante como você, Gui!

Ao Laboratório de Biologia Cromossômica: Estrutura e Função (Chromosome Biology: Structure & Function Lab) da Universidade Estadual de Ponta Grossa e a todos os seus integrantes. À Geize Deon, pelas ajudas em vários processos laboratoriais e parceria nas coletas. À Caroline Machado e Michele Wolski (*sisters*) pela descontração e incentivo de sempre. Aos colegas que dividiram o ambiente laboratorial comigo durante o desenvolvimento desta tese: Viviane, Lucas, Thais, Sebastião, Matheus, Michele Orane, Marcela, Larissa, Emanuel, Jordana, Khaline. e Prof. Dr<sup>a</sup>. Viviane Nogaroto. Agradeço muito aos meus amigos de sempre, Paulo Svidnicki e Alain Victor Barros, pela parceria e discussões científico-éticas, desde a graduação e mestrado.

Agradeço à toda minha família: Helena, Valmírio (*in memoriam*), Denisar (*in memoriam*), Tereza, Valdeci, Hamilton, Sérgio, Marli, Sílvia, Walmensi, Vanderli, Dicléia, Débora, Adriane, Marcus Vinícius, Alexandre, Natália, Miguel, Roger, Ramon, Pedro, Isabela, Larissa e Arthur.

O ambiente externo ao laboratório influencia muito na manutenção do foco para o trabalho, portanto gostaria de agradecer aos meus grandes amigos: Felipe Krüger, Lucas Santos, Jean Rafael, Paulo Caillot, Rodrigo Caillot, Jean Martins, Ricardo Rupp, Cláudio Pires, Emerson Pires, Thiago Moro, Lincoln Almeida, Iversen Marim, Antônio Junior, Tiago Blagieski, Alyson Antero, Marcelo Jasluk, Paulo Szczepanski, Maykon Voinaroski e Lucas Camargo.

Não poderia deixar de lembrar dos companheiros caninos, que estiveram atentos ao meu lado durante muito tempo de escrita e labuta neste manuscrito. Valeu, Bóris, Shaman e Cacaú.

Ao Prof. Dr. Cláudio Oliveira e à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Campus Botucatu pelo empréstimo de tecidos utilizados neste trabalho, e a todos os envolvidos nas coletas e preparação destes materiais.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). À Fundação Araucária. À Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR.

Agradeço especialmente à minha namorada e companheira de vida, Gabriela da Rosa Silva, não só pelo apoio e companheirismo durante esta árdua etapa, mas também pelas correções e sugestões no texto, além de ajudas em recursos gráficos. Amo tu.

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado”

Gandalf (J.R.R. Tolkien – O Senhor dos Anéis)

## RESUMO

A evolução e distribuição dos peixes neotropicais está intimamente ligada a eventos geológicos de dispersão. Um importante mecanismo que acaba por promover a dispersão e a evolução de espécies de peixes é o evento conhecido como captura de cabeceiras de rios. Estes eventos interconectam bacias adjacentes e isolam bacias que eram previamente conectadas, promovendo ao mesmo tempo o isolamento (vicariância) e a dispersão (geodispersão) de espécies de peixes. Nas regiões sul/sudeste do Brasil alterações do relevo promoveram eventos de captura de cabeceiras de rios e intercâmbio de fauna entre drenagens costeiras, com rios de bacias das regiões mais altas que compõem o escudo cristalino brasileiro. O gênero *Isbrueckerichthys* (Loricariidae: Neoplecostominae) é endêmico do sul e sudeste brasileiro, constituindo um grupo chave para as investigações dos eventos de captura de cabeceira nesta região. O objetivo deste trabalho foi inferir os padrões de distribuição geográfica e de diversidade genética de populações de *Isbrueckerichthys* em regiões limítrofes ao Arco de Ponta Grossa para as bacias dos rios Ribeira de Iguape e Tibagi e inferir sobre a história evolutiva associadas aos eventos geológicos de captura de cabeceiras de rios na diversificação do grupo. Para isso foram realizadas análises de identificação molecular e de delimitação de espécies utilizando *DNA barcoding* e GMYC usando o gene citocromo c oxidase subunidade I. Para as investigações populacionais foram utilizadas análises moleculares de variância e de diversidade, inferências filogenéticas e filogeográficas, relógio molecular, além de índices de genética de populações, como  $\Phi_{ST}$ , diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica, rede haplotípica, Teste de Mantel e análises bayesiana de estruturação. *Isbrueckerichthys saxicola* e *Isbrueckerichthys calvus* demonstram ser uma única categoria taxonômica tanto nas análises de divergência genética K2P (1,32%  $\pm$  0,022%), quanto nas análises filogenéticas e de GMYC. As análises populacionais apontam para uma alta diversidade haplotípica ( $h$ )= 0,859 e diversidade nucleotídica ( $\pi$ )=0,05026. O teste de Mantel aponta para uma forte correlação entre a distribuição geográfica e a diversidade genética. As análises mostram ainda um cenário onde o ancestral de *Isbrueckerichthys* partiu das bacias costeiras do Atlântico para as terras mais altas através de um processo de captura de cabeceira de rios há cerca de 12 milhões de anos atrás. Os resultados confirmam a hipótese de que eventos de captura de cabeceiras na região do Arco de Ponta Grossa contribuíram para a diversidade de *Isbrueckerichthys* e moldaram a sua distribuição na bacia do rio Tibagi, e ainda, propõe a especiação incipiente entre *I. saxicola* e *I. calvus* nesta região.

**Palavras chave:** biogeografia, captura de cabeceiras, delimitação de espécies, GMYC.



## ABSTRACT

The evolution and distribution of Neotropical fish are strictly linked to geologic events of dispersion. An important mechanism that promote the species dispersion and the evolution of fishes is the event known as headwaters capture or river capture. This kind of geological events interconnects adjacent basins and isolate the ones that were previously connected, promoting at same time the isolation (vicariance) and the dispersion (geodispersion) of fish species. In Brazilian south/southeast regions geographical alterations promoted events of river capture and faunal interchange between coastal drainages and higher of the Brazilian crystalline shield. The genus *Isbrueckerichthys* (Loricariidae: Neoplecostominae) is endemic of Brazilian south/southeast, making them a key group to understand the evolutive effects of river capture events in these regions. The aim of this work was to infer patterns of geographic distribution and genetic diversity of *Isbrueckerichthys* in bordering regions of the Ponta Grossa Arch for the Ribeira de Iguape and Tibagi rivers basins. Also, to prospect the evolutionary history associated with geologic events of river capture in the group diversification. For this purpose, were performed molecular identification and species delimitation analysis of DNA barcoding and GMYC using cytochrome c oxidase subunit I. For the populational investigations were performed Analysis of Molecular Variance and diversity, phylogenetic and phylogeographical inferences, molecular clock, besides the population genetics index, as  $\Phi_{ST}$ , haplotipic diversity, nucleotic diversity, haplotipic diversity, haplotipic network, Mantel Test and bayesian analysis of structuration. *I. calvus* and *I. saxicola* behaves as a single taxonomic category both in relation to K2P genetic divergence (1,32%  $\pm$ 0,022%), as in GMYC and phylogenetic inferences. Populational analysis shown a high haplotipic diversity ( $h$ ) = 0,859 and nucleotic diversity ( $\pi$ ) = 0,05026. Mantel Test shown a strong positive correlation among geographic distribution and genetic diversity. Analysis also shown a scenario where the *Isbrueckerichthys* ancestral reaches the higher lands from the coastal Drainages through a river capture process about 12 million years ago. The results confirm the hypothesis that driver capture events in Ponta Grossa Arch region contributes for the diversity and shape their distribution in Tibagi river basin, and proposes the incipient speciation among *I. saxicola* e *I. calvus* in this region.

**Key-words:** biogeography, headwaters capture, species delimitation, GMYC

## LISTA DE FIGURAS

### MATERIAL E MÉTODOS

**Figura 1.** Mapa hidrológico do sul e sudeste brasileiro, com ênfase para o estado do Paraná, incluindo as localidades de coleta de cada espécie de *Isbrueckerichthys*. As cores diferentes representam a divisão geológica do estado do Paraná, com ênfase para a divisão entre o Primeiro (marrom claro) e Segundo Planalto (marrom escuro), conhecido como Arco de Ponta Grossa (Escarpa Devoniana).....**26**

### CAPÍTULO 1

**Figura 2.** Árvore de *neighbor-joining* para *Isbrueckerichthys* usando as distâncias genéticas através do modelo evolutivo de K2P+G. Números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* com 1000 replicações.....**50**

**Figura 3.** Consenso das três árvores obtidas independentemente para os três diferentes *priors* para análise bayesiana (*Yule, Birth and Death e Coalescent*). Acima o gráfico da análise de *threshold* para GMYC.....**51**

### CAPÍTULO 2

**Figura 4.** Árvore de máxima verossimilhança inferida no PhyML, programado com o modelo de substituição de nucleotídeos K2P+G. Números acima dos ramos indicam os valores de confiabilidade do teste de *bootstrap* com 1000 replicações.....**75**

**Figura 5.** Árvore filogenética inferida através de análise bayesiana no BEAST, com 100.000.000 de gerações de Monte Carlo via Cadeias de Markov, com relógio relaxado não correlacionado, distribuição lognormal, *birth and death prior*, 8 categorias gama, programada com o modelo de substituição K2P+G. Números acima dos ramos representam os valores de probabilidade posterior.....76

**Figura 6.** Rede haplotípica construída através do algoritmo de *median-joining* usando seqüências de COI de *Isbrueckerichthys* (no topo). Círculos representando os haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo, e as cores referem-se a espécies/populações diferentes. Abaixo, distribuição dos haplótipos nos locais de coletas.....77

**Figura 7.** Filogenia calibrada no tempo geológico para COI, realizada no BEAST. Usando 3 tempos diferentes de calibração. O relógio molecular considerado foi o modelo relaxado não correlacionado, usando o *prior* de *Birth and Death*. A escala está representada em milhões de anos.....78

**Figura 8.** (a) Gráfico de estruturação populacional do STRUCTURE, usando o “modelo sem mistura” com K=2 (*I. duseni*/*I. saxicola*+*I. calvus*); (b) gráfico da análise de *bayesian skyline plot* das linhas através do tempo (eixo x).....79

**Figura 9.** Teste de Mantel com a correlação ente as distâncias genéticas e as distâncias geográficas dos indivíduos amostrados (correlação positiva com  $r^2=0.6234$ , com  $p<0.00099$ ).....80

## LISTA DE TABELAS

### MATERIAL E MÉTODOS

**Tabela 1.** Localidades de coletas dos indivíduos de *Isbrueckerichthys*, identificação taxonômica  $\alpha$  (morfológica) e os dados de geolocalização.....28

**Tabela II.** Tabela contendo as sequências de COI mineradas de bancos de dados e seus respectivos números de acesso.....32

### CAPÍTULO 1

**Tabela III.** Tabela contendo as distâncias genéticas entre os grupos de *Isbrueckerichthys* e o desvio padrão usando o modelo evolutivo de substituição K2P+G.....48

### CAPÍTULO 2

**Tabela IV.** Resumo das identificações morfológicas  $\alpha$  confrontadas com as identificações moleculares  $\beta$ , obtidas na ferramenta de identificação por similaridade do *BOLD systems*, com a porcentagem de identificação e similaridade de cada identificação.....49

**Tabela V.** Lista dos exemplares amostrados, suas identificações, números de acesso e localidade de coleta.....72

**Tabela VI.** Estatísticas moleculares e melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos para as sequências de COI de *Isbrueckerichthys*.....73

**Tabela VII.** Índices de fixação  $\Phi_{ST}$  baseados na estruturação considerando (*I. duseni*; *I. saxicola* + *I. calvus*).....74

## LISTA DE ABREVIATURAS

2n – Número diplóide

AMOVA – *Analysis of Molecular Variance* (Análise de Variância Molecular)

BOLD – *Barcode of Life Systems*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BSP – *Bayesian Skyline Plot*

COI ou COX1 – Citocromo oxidase c subunidade I

CTAB - cetyltrimethylammonium bromide

ESS – Effective Sample Size (Tamanho Efetivo Populacional)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato

$\Phi_{ST}$  – estatística phi

FISH-BOL – The Fish Barcode of Life Initiative

G – Gama

GC – Conteúdo de Guanina-Citosina

GMYC – *Generalized Mixed Yule-Coalescent*

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

HKY – Modelo “Hasegawa, Kishino, Yano”

K2P – Modelo “Kimura-2-Parâmetros”

KCl – Cloreto de Potássio

m - Metacêntrico

MCMC – Markov Chains of Monte Carlo (Monte Carlo via Cadeias de Markov)

mDNA – DNA mitocondrial

m.a. – Milhões de anos

mM: milimolar

$\mu$ M: micromolar

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

n – Número de indivíduos

NCBI – National Center for Biotechnology Information

nDNA – DNA nuclear

ng - Nanograma

Nupélia - Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura

pb – pares de base

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

pH - Potencial hidrogeniônico

$\pi$  – diversidade nucleotídica ( $\pi$ )

rDNA – DNA ribossomal

sm – Submetacêntrico

SPLITS – *SPecies Limits by Threshold Statistics*

st/a – Subtelocêntrico/acrocêntrico

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

Taq – *Termophilus aquaticus*

U – Unidade

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Filogeografia e eventos geológicos associados à dinâmica populacional na região neotropical.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Loricariidae, Neoplecostominae, Isbrueckerichthys.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 DNA barcoding e análises moleculares.....</b>	<b>20</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Coleta de material biológico.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 Análises moleculares e populacionais.....</b>	<b>28</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Capítulo 1.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Capítulo 2.....</b>	<b>32</b>
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Análise de DNA barcoding revela uma discordância entre identificação de espécie morfológica e molecular entre espécies de <i>Isbrueckerichthys</i> (Siluriformes: Loricariidae).....</b>	<b>33</b>
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Filogeografia molecular de populações de <i>Isbrueckerichthys</i> (Siluriformes: Loricariidae) baseada em eventos geológicos históricos.....</b>	<b>52</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>81</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### *1.1 Filogeografia e eventos geológicos associados à dinâmica populacional na região neotropical*

A ictiofauna da região neotropical é uma das que apresenta um dos maiores índices de biodiversidade do mundo, contando atualmente com mais de 4000 espécies descritas (REIS et al., 2003). No entanto, segundo algumas estimativas este número pode atingir até 8.000 espécies (SCHAEFER, 1998; VARI; MALABARBA, 1998). A razão para essa diversidade pode ser tanto ecológica quanto histórica, resultado de milhões de anos de evolução, desde a separação do supercontinente Gondwana até o presente.

A biogeografia é definida por Nelson (1985), como “a interrelação, ou síntese, da geologia e biologia”. A dificuldade dos biólogos em entender e sintetizar os processos geológicos e associá-los à distribuição e evolução das espécies constitui uma séria limitação para o conhecimento da biogeografia dos peixes neotropicais (NELSON, 1985).

A biogeografia da ictiofauna da região Neotropical, no entanto, é pouco conhecida. De acordo com Vari e Weitzman (1990), os quatro fatores limitantes importantes para a biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul são: 1) as escassas informações quanto à sistemática em nível de espécies 2) distribuição inadequada da informação para a maioria das espécies; 3) dados não existentes ou esparsos sobre a história filogenética da maioria dos táxons supra específicos; e 4) a dificuldade da associação de hipóteses filogenéticas com a história geológica do continente.

A maior parte da informação disponível sobre a biogeografia dos peixes de água doce neotropicais vem de dados filogenéticos derivados de estudos de revisão de alguns grupos particulares, em que o objetivo é estritamente focado em esclarecer as relações entre áreas de endemismo baseados em análises de cladograma de área (VARI, 1988; SCHAEFER, 1997; REIS, 1998; VARI; HAROLD, 2001; COSTA, 2001). Quando disponível, inferências geológicas nestes estudos foram baseadas em eventos geológicos



maiores e melhor compreendidos, como é o caso do soerguimento das cordilheiras dos Andes (RIBEIRO, 2006).

A placa continental sul-americana é definida como sendo a porção estável da placa da América do Sul não afetada pelas zonas orogênicas do Caribe e dos Andes (ALMEIDA et al., 2000). É formada pela Plataforma Brasileira e pela Plataforma Patagônica e as províncias estruturais da Plataforma Sul-americana são identificadas de acordo com sua origem como áreas cratônicas, cintos orogênicos antigos e bacias sedimentares (ALMEIDA et al., 1981). Durante as eras orogênicas, estas áreas comportaram-se como blocos rígidos, com cintos móveis se desenvolvendo ao redor deles. Quando erodidos e expostos, estes cratons são então chamados de escudos (PENHA, 1998).

As mesmas interações móveis entre placas que ocorrem hoje também ocorreram durante a maior parte da história geológica da Terra, durante os quais porções diferentes da atual América do Sul estavam envolvidos na amalgamação e quebra de diversos supercontinentes durante os ciclos orogênicos como os supercontinentes Atlântida (Paleoproterozoico), Rodinia (Mezoproterozoico), Gondwana Ocidental (Neoproterozoico) e Pangeia (Carbonífero) (CORDANI et al., 2000; SAENZ et al., 2003).

Associada com a estrutura principal e com as províncias sedimentares na Plataforma da América do Sul estão complexos sistemas de falhas, assim como um amplo sistema de vulcanismo extrusivo e intrusivo (THOMAZ-FILHO et al., 2000). Esta é uma herança da amalgamação continental durante os ciclos orogênicos e, concomitantemente, com relação ao processo de rifteamento relacionado à quebra do supercontinente precursor (o qual hoje constitui a porção referente a atual América do Sul) estava envolvido (THOMAZ-FILHO et al., 2000). Rifteamento e magmatismo associados à quebra do Gondwana são encontrados na maior parte das províncias tectônicas e sedimentares da Plataforma da América do Sul (THOMAZ-FILHO et al., 2000).

A imposição tectônica de paleodrenagens do escudo cristalino brasileiro é uma das mais importantes implicações para a biogeografia da biota aquática continental resultantes da história geológica e tectônica da América do Sul (RIBEIRO, 2006). De acordo com o modelo proposto por Cox (1989) a formação de um arco com centenas de quilômetros impôs um padrão de drenagem, com rios correndo do centro da deformação do megadomo. Este processo supostamente atuou em diversas porções das margens continentais da África e América do Sul, dando origem a seis megadomos (POTTER,

1997). Os padrões criados por essas áreas de soerguimento ainda são evidentes. A reativação Mesozoica resultou em padrões de drenagem em longas e sinuosas rotas através do escudo cristalino Brasileiro antes de descarregar suas águas no recém-aberto oceano Atlântico, para aqueles rios que evoluíram ao longo da borda destas deformações em arco (POTTER, 1997; RIBEIRO, 2006).

Com o final da reativação e a quebra completa do Gondwana teve início a história independente dos rios com influência atlântica na América do Sul. Estes rios formam uma série de bacias hidrográficas isoladas, conhecidas como Drenagens Costeiras do Leste do Brasil (do inglês, *Coastal Drainages*), com os sistemas hidrográficos primários sendo os rios Paraguaçu, Contas, Jequitinhonha, Doce, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape, Itajaí e Jacuí (RIBEIRO, 2006). Estas, além de outras diversas bacias menores, são separadas por paisagens escarpadas e montanhosas na margem leste do escudo cristalino Brasileiro (RIBEIRO, 2006).

A história do segmento da costa sudeste do continente sul-americano no pós-Cretáceo é melhor compreendida quanto sua estrutura e composição. De acordo com Cobbold et al. (2001) a margem obliquamente rifteada do sudeste do Brasil é caracterizada por um contexto contrastante em relação à visão tradicional de margem Atlântica passiva do Brasil. Padrões de topografia e drenagens provêm evidências de soerguimentos recentes, blocos de falhas e capturas de rios, todos estes sendo sintomáticos de atividade tectônicas (COBBOLD et al., 2011).

Abel et al. (2008) por meio de uma análise sintética de endemismo de peixes, propuseram quatro ecorregiões para o sudeste brasileiro: a região costeira da bacia do rio Paraíba do Sul, do Ribeira de Iguape, e do sudeste da mata Atlântica, e o interior da região sudeste que engloba as bacias do Alto e Médio Paraná.

Para Ribeiro (2006) os eventos cladogenéticos em uma visão filogenética sugerem que os processos que ocorreram entre as regiões costeiras e o interior do escudo cristalino desenvolveram-se em longos períodos de tempo e ocorrem de, uma maneira geral, de forma repetitiva, dando origem a padrões de relações entre grupos-irmãos, porém com diferentes tempos de origem e com diferentes estágios de inclusividade, refletindo períodos de vicariância contínua. De uma forma intuitiva, como os padrões de relações filogenética possuem diferentes níveis de inclusividade em diferentes tempos de origem, as relações que incluem clados amplos, com nível subfamiliar ou familiar são os mais

antigos em relação aos eventos que incluem táxons mais próximos que são, teoricamente, mais recentes.

Sendo assim, Ribeiro (2006) definiu três tipos de padrões de relações filogenéticas que representam os eventos cladogenéticos em diferentes tempos e representam diferentes graus de inclusividade entre táxons costeiros e do interior, sendo eles: Padrão A, que são os eventos mais antigos, e incluem relações mais amplas, sendo exemplificado pelas relações entre as subfamílias de Trichomycteridae, Trichogeninae e Copionodontinae e também pelo gênero *Wertheimeira* de Doradidae.

Já o Padrão B, representa os eventos com uma história que apresentam intermediário grau de inclusividade, com relações filogenéticas, em geral, no nível de gênero, sendo exemplos as relações filogenéticas entre *Scleromystax* e *Aspidoras* (família Callichthyidae), entre os gêneros *Lignobrycon* e *Triportheus*, ou entre *Rhinelepis* e *Poogonopoma wertheimeri*.

O Padrão C por sua vez representa os eventos vicariantes mais recentes entre as terras altas do escudo cristalino e as bacias adjacentes da região costeira. Como são os eventos mais recentes, o grau de inclusividade das relações filogenéticas, em geral, é no nível de espécies, e em alguns casos apresentam verdadeiras “zonas híbridas”.

Os genomas das populações e espécies possuem assinaturas genéticas da história demográfica evolutiva, que quando reconstruída pode levar a *insights* de vários processos quanto à evolução e eventos genéticos populacionais. Estes processos podem ser correlacionados com eventos históricos, como alterações paleoclimáticas e outros fatores que moldaram a dinâmica populacional passada (DRUMMOND et al., 2005; CAMPOS et al. 2010; FINLAY et al., 2007; ATKINSON et al., 2008; STILLER et al., 2010). Essa história geológica e o padrão de evolução da paisagem do sul e sudeste brasileiro, portanto, tem grande efeito na distribuição e evolução das espécies incluídas nestas áreas geológicas.

Os níveis de flutuação demográfica populacionais durante o tempo são uma das características que podem ser investigadas baseadas em eventos paleoclimáticos, geológicos e com base em suas assinaturas genéticas presentes nas populações recentes (DRUMMOND et al., 2005). Pybus et al. (2000) demonstraram uma série de abordagens para estimativas dos padrões históricos de flutuação do tamanho populacional, conhecidas como *skyline plot*, considerando a complexidade dos possíveis modelos

demográficos. Posteriormente, outros modelos baseados na premissa da técnica de *skyline plot* foram desenvolvidas, como *Bayesian Skygrid* (MININ et al., 2008) e *extended bayesian skyline plot* (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007).

As técnicas que utilizam *skyline plot* baseiam-se, de uma maneira geral, na teoria da coalescência (KINGMAN, 1982). Neste modelo, as linhagens são rastreadas do presente até as gerações passadas, a partir de uma amostra de sequências, onde pares de sequências coalescem aleatoriamente até um ancestral comum. A reconstrução é então baseada na inferência da genealogia e do cálculo do tamanho efetivo populacional (i.e., o número de indivíduos que contribuem para a geração descendente) em diferentes níveis do tempo evolutivo da genealogia estimada (HO; SHAPIRO, 2011).

Quanto à escolha do número de *loci* a serem analisados e as particularidades das regiões, Ho e Shapiro (2011) sugeriram que as sequências devem ser obtidas de indivíduos amostrados randomicamente de uma população pan-mítica. As sequências devem ser ortólogas, não recombinantes e com evolução neutra. O número de *loci* pode ser variável, sendo que um único *locus* pode ser suficiente para algumas populações, enquanto outras necessitam de uma abordagem multi-*loci* (HELED; DRUMMOND, 2008). O aumento do número de *loci*, mesmo quando apenas *locus* único seja o suficiente, aumenta a sensibilidade para a detecção e análise de gargalos (*bottlenecks*) populacionais (HELED; DRUMMOND, 2008).

O DNA mitocondrial possui particularidades que o tornam alvo para a escolha de *loci* para análises moleculares e populacionais, por exemplo, as análises de *DNA Barcode skyline plot*, entre outras (HO; SHAPIRO, 2011). O DNA mitocondrial evolui em uma taxa mais acelerada que o DNA nuclear, o que lhe atribui maior número de diferenças e de sítios informativos (BROWN, 1982; WILSON et al., 1985; SACONNE et al., 1999). Além disso, de uma maneira geral, o genoma mitocondrial não sofre processos de recombinação. Finalmente, a herança uni-parental maternal do DNA mitocondrial reproduz a história evolutiva de uma maneira que não é influenciada caso os processos populacionais sejam enviesados pelo sexo (HO; SHAPIRO, 2011).

## ***1.2 Loricariidae, Neoplecostominae, Isbrueckerichthys***

Loricariidae é uma família de peixes Neotropicais, a sua distribuição se dá ao longo da maior parte da região tropical. Suas espécies representantes ocorrem desde a Costa Rica até o sul da Argentina (REIS et al., 2003). Em quantidade é uma das maiores famílias entre os peixes neotropicais de água doce. Possui mais de 970 espécies reconhecidas (ESCHMEYER; FONG, 2018), com muitas espécies que ainda aguardam descrição (REIS et al., 2003; ESCHMEYER; FONG, 2018).

Neoplecostominae é uma das seis subfamílias de Loricariidae, e inclui 37 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2018). Os indivíduos deste grupo apresentam uma forma anatômica que varia de pequeno a médio porte (ESCHMEYER; FONG, 2018). É atualmente subdividida nos gêneros *Kronichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Pareiohaphis*, *Pareiohina*, *Neoplecostomus* e *Pseudotocinclus* (MONTROYA-BURGOS et al., 1998; ARMBRUSTER 2004; CHIACHIO et al. 2008).

Espécies de Neoplecostominae são encontradas em rios e riachos de tamanho pequeno ou médio, com alta concentração de oxigênio, com água clara, profundidade de rasa a média (< 1 m de profundidade), correnteza de leve a moderada, com pedras soltas no fundo e substrato arenoso (LANGEANI, 1990; PEREIRA; REIS, 2002). O corpo dos loricarídeos é recoberto por placas dérmicas rígidas, motivo pelo qual são popularmente conhecidos como cascudos (do inglês - *armored catfishes*), e possuem a boca situada na região ventral do corpo, em forma de ventosa (REIS et al., 2003).

Howes (1983) foi o primeiro a realizar uma análise cladística de dados osteológicos e miológicos, encontrando seis grupos monofiléticos para a família (Loricariinae, Hypoptomatinae, Hypostominae, Neoplecostominae, Lithogeninae e Chaetostominae). Posteriormente, Schaefer (1987), em análise cladística, também encontrou seis subfamílias em Loricariidae (Lithogeneinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Loricariinae, Ancistrinae e Hypostominae), justificando que Neoplecostominae é composta somente por *Neoplecostomus*.

Montoya-Burgos et al. (1998) realizaram estudo filogenético de Loricariidae baseado em dados moleculares (sequências parciais de genes de rRNA 12S e 16S) e mostraram que *Hemipsilichthys gobio* era grupo irmão das demais espécies analisadas.

Além disso, estes autores demonstraram que *Neoplecostomus* era estritamente relacionada a *Hemipsilichthys splendor*, *Hemipsilichthys* sp., *Isbruckerichthys duseni*, *Kronichthys* sp., *Pseudotocinclus tietensis*, *Pareiorhina* sp., e *Hypoptopoma bilobatum* (MONTROYA-BURGOS et al., 1998).

Armbruster (2004) realizou um estudo compreensivo de loricarídeos e expandiu Neoplecostominae para incluir *Hemipsilichthys* (exceto *H. gobio*), *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Neoplecostomus*, e *Pareiohina*, embora este grupo não tenha aparecido como um grupo monofilético na análise.

A monofilia de Neoplecostominae é, portanto, bem suportada, assim como sua taxonomia e sistemática é bem estudada (ISBRUCKER, 1980; HOWES, 1983; SCHAEFER, 1987; MONTROYA-BURGOS et al., 1998; ARMBRUSTER, 2004; REIS et al., 2006; CHIACHIO et al., 2008; CRAMER et al., 2007, 2011). No entanto as relações evolutivas entre as espécies endêmicas do sul e sudeste brasileiro permanecem obscuras e pouca estudadas, devido à dificuldade na reconstrução dos processos hidrogeológicos que ocorrem nos Neotrópicos (RIBEIRO et al., 2006, ALBERT et al., 2011).

Neoplecostominae é um grupo restrito ao sul e sudeste brasileiro. Por serem endêmicos a esta região particular, estas espécies tornam-se um grupo chave para a investigação de padrões biogeográficos e eventos históricos filogeográficos envolvendo a região geológica em questão, uma vez que sua história evolutiva está intimamente ligada à história evolutiva da paisagem.

### ***1.3 DNA Barcoding e análises moleculares***

Um das questões cruciais para o desenvolvimento de estudos filogeográficos é a correta delimitação de espécies para o grupo em foco (DE QUEIROZ, 2007). Em termos evolutivos gerais, as espécies podem ser consideradas como grupos de organismos que evoluem independentemente de outros grupos, e que posteriormente divergem em unidades morfológicas discretas e organizam-se em diferentes níveis de variação genética que podem ser observados em clados distintos (DE QUEIROZ, 2007).

Segundo Hebert et al. (2003), a identificação de espécies baseada estritamente na diagnose morfológica tem algumas limitações significativas: (1) a plasticidade fenotípica

e a variabilidade genética nos caracteres empregados para o reconhecimento e diferenciação de espécies pode levar a identificações incorretas; (2) a análise estritamente morfológica negligencia táxons crípticos que são comuns em muitos grupos (KNOWLTON, 1993; JARMAN; ELLIOTT, 2000); (3) as chaves de identificação morfológicas são, geralmente, aplicáveis a apenas um estágio de vida ou restritas a apenas um sexo; (4) e finalmente, o uso destas chaves taxonômicas requer um alto nível de experiência do taxonomista no grupo em questão, o que pode levar a um alto nível de diagnose errônea por demais pesquisadores.

Algumas vantagens para o uso do DNA mitocondrial, especificamente para um sistema padronizado de identificação molecular *single locus* são: o genoma mitocondrial não possui *introns*, tem taxa de recombinação limitada e possui um modo de herança haploide (SACCONE et al., 1999). Além disso, *primers* específicos e robustos também permitem a rotina de sequenciamento de segmentos específicos do genoma mitocondrial (FOLMER et al., 1994; SIMMONS; WELLER, 2001). *Indels* (inserções e deleções) no DNA mitocondrial são raros, uma vez que levam à mudança na estrutura de códons de leitura e acarretam em alterações em algum dos 13 genes codificadores de proteínas encontrados no genoma mitocondrial animal (SIMMONS; WELLER, 2001).

Por sua vez, dentre os diferentes genes codificadores do DNA mitocondrial animal, o gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) possui características únicas que o tornam o melhor candidato para a padronização de um sistema de identificação molecular universal (FOLMER et al., 1994; ZHANG; HEWITT, 1997). Segundo revisão de Hebert et al. (2003) entre as características que habilitam o COI estão: (i) a robustez e eficiência dos conjuntos de *primers* recuperando a porção 5' em representantes da maioria dos animais, o que aumenta o grau de padronização dos fragmentos obtidos; (ii) o maior sinal filogenético, principalmente de eventos mais distantes, do COI com relação a qualquer outro gene mitocondrial; (iii) os nucleotídeos de terceira posição do COI apresentam uma alta incidência de substituição de bases, levando a uma taxa de evolução três vezes maior que a do DNAr 12S e 16S (KNOWLTON; WEIGHT, 1998); (iv) A taxa de evolução do COI é rápida o suficiente para discriminar não somente espécies diferentes, mas também grupos filogenéticos distintos dentro da mesma espécie (COX; HEBERT, 2001; CUNNINGHAM, 2001; FOLMER et al., 1994; HEBERT et al., 2003; KNOWLTON; WEIGHT, 1998; SIMMONS; WELLER, 2001; WARES; ZHANG; HEWITT, 1997).

Com base nessas premissas foi desenvolvido e descrito um sistema de identificação molecular através de “*barcodes* genéticos” (HEBERT et al., 2003), ou *DNA barcoding*. O *DNA barcoding* consiste em uma técnica de identificação de espécies através do sequenciamento e comparação de uma região de, aproximadamente, 650 pb do gene Citocromo c oxidase subunidade I (COI) (IVANOVA et al., 2007). O método é capaz de discriminar uma ampla variedade de animais a nível de espécies. A base teórica da técnica consiste de que a variação de sequências dentro de espécies é muito menor do que a variação de sequências comparadas entre espécies diferentes, sendo denominadas de divergência intra e interespecífica, respectivamente (HEBERT et al., 2004).

Estudos posteriores à padronização do *DNA barcoding* evidenciaram que para táxons mais bem estudados, como aves e peixes, a técnica permite identificações precisas em nível específico (KERR et al., 2007; TAVARES; BAKER, 2008; WARD et al., 2008).

A partir de então, bancos de dados e consórcios de acesso público, específicos para dados de *barcoding*, foram posteriormente desenvolvidos para permitir o acesso universal, a padronização e a comparação dos dados para identificação, como o *Barcoding of Life Data Systems* (BOLD *systems*) (RATSNASINGHAM; HEBERT, 2007), FISH-BOL (específico para Peixes), entre outros.

Embora os valores de diferenciação intra e interespecífica possam apresentar um *gap*, a utilização de um padrão de valor de limite (do inglês - *threshold limit*) para delimitar espécies não previamente reconhecidas foi proposta por Hebert et al. (2003). Estes autores consideram, a média de 10 vezes de divergência intra x interespecífica para a determinação de um táxon (HEBERT et al., 2004). Porém, estes valores padrões podem subestimar espécies crípticas menos divergentes (HICKERSON et al., 2006) e aquelas que mostram menor diferenciação do COI do que espécies já previamente reconhecidas.

Nesse sentido, os valores padrões limites para diferenciação de espécies devem ser investigados em níveis menores de abrangência e mais específicos para determinados grupos. Nesta abordagem e visando a padronização de valores de divergência para *barcoding* em grupos específicos, Ward (2009) analisou a eficácia da técnica em Peixes e Aves.

Entre os peixes, por exemplo, Ward (2009) analisou dados de *DNA barcoding* referente a publicações envolvendo 1088 espécies. A proporção de ineficácia para identificação de espécies através do COI como marcador foi de apenas 2,1-2,5% (WARD,



2009). Comparando dados publicados para espécies de peixes e aves, este autor observou que valores de divergência são significativamente maiores para COI em relação a Aves e que valores de divergência acima de 2% provavelmente (probabilidade > 95%) demonstram tratar-se de espécies diferenciadas (em peixes) (WARD, 2009). Casos de indivíduos conespecíficos excedendo 3% de divergência foram mais notáveis em peixes do que em aves, porém com valores de ocorrência muito baixos (0,87% para Peixes e 0,03% para Aves) (WARD, 2009).

Ward (2009) encontrou exemplos de espécies de peixes que podem ser separadas por *DNA barcoding* utilizando COI como marcador, mas que mostraram algum tipo de compartilhamento de haplótipos. Estes exemplos podem surgir por eventos de hibridização passada, especiação recente, amostragem incompleta (*incomplete haplotype sorting*), e por identificação errônea (*mislabelling*).

Ward (2009) descreveu que em algumas situações estes valores estimados não são apropriados, como por exemplo, para o caso das espécies de ciclídeos dos Lagos Africanos, que possuem origem recente e que culminou em mais de 500 espécies em aproximadamente 400.000 anos, sendo que a maior parte da diversificação ocorreu nos últimos 100.000 anos (VERHEYEN et al., 2003). Neste caso, por exemplo, espécies diferentes podem apresentar valores de divergência do COI nulos, e genes com taxas de evolução mais rápidas seriam necessários para a delimitação das espécies.

April et al. (2013) propuseram que indivíduos de peixes com valores de divergência genética acima de 2% são, geralmente, incompatíveis sexualmente. Embora os valores de divergência genética associados aos marcadores moleculares utilizados com o propósito de identificação molecular sejam padronizados para alguns organismos, é conhecido que alguns valores de limites para as divergências intra/interespecíficas são variáveis, e são influenciados pela variação na taxa de substituição de nucleotídeos entre as linhagens (BARRACLOUGH et al., 2009).

Inferências evolutivas baseadas em dados *single locus*, como o *DNA barcoding*, possuem limitações, incluindo menor poder de detecção de eventos evolutivos independentes (KNOWLES; CARSTEN, 2007; DUPUIS et al., 2012). Outro problema é a possível discordância entre as árvores de espécies e as árvores dos genes (HAILER et al., 2012) e a falta de informação com relação a divergência adaptativa (WILL; RUBINOFF, 2004). Contudo, estudos com dados de *locus* único contém um registro

genético da história evolutiva (AVISE, 2009) e provêm informações úteis e confiáveis com relação aos padrões evolutivos de diversidade em grandes escalas (MONAGHAN et al., 2009).

Partindo dessas premissas, diversos métodos de delimitação de espécies baseados em dados de *locus* único foram propostos. Um destes métodos, o GMYC (*Generalized Mixes Yule-Coalescent*) não leva em consideração simplesmente a distância genética e, nem necessita de hipóteses *a priori* de associações putativas de espécies, baseadas em taxonomia clássica (PONS et al., 2006).

O GMYC foi introduzido por Pons et al. (2006), e é um método desenhado para delimitar espécies usando dados de *locus* único, através de “evolução independente”, onde a premissa é que mutações que surgem em uma espécie não podem se espalhar imediatamente para outras espécies (TEMPLETON, 1989; BARRACLOUGH et al., 2003; DE QUEIROZ et al., 2007). Neste caso, a evolução independente leva ao aparecimento de *clusters* genéticos distintos, separados por ramos internos mais longos (BARRACLOUGH et al., 2003).

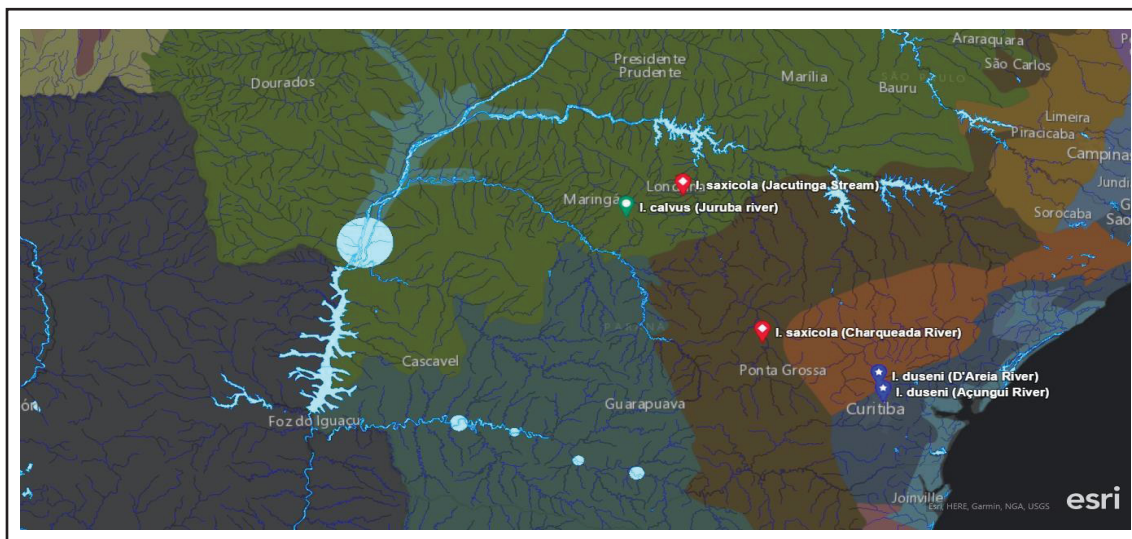
## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A intensa atividade tectônica e os eventos que ocorreram na formação geológica durante o realojamento dos continentes promoveram um intrincado sistema de falhas, vulcanismo e cintos móveis entre as regiões do escudo cristalino brasileiro, nas porções mais altas do continente, com as regiões adjacentes das margens costeiras com influência do Oceano Atlântico. Essa intensa atividade geológica teve fundamental papel na moldura da paisagem, nos intrincados sistemas de paleodrenagem da região (através de eventos de captura de cabeceiras, por exemplo) e, conseqüentemente, na configuração atual de distribuição de espécies de peixes neotropicais e em sua história evolutiva. As espécies de peixes neotropicais que habitam a região possuem, em sua maioria, um alto grau de endemismo. O alto endemismo acontece, por exemplo, entre os representantes do gênero *Isbrueckerichthys*, os quais estão limitados às bacias do rio Ribeira de Iguape (costeira) e do rio Tibagi (Alto Paraná). Por serem estritamente endêmicas, e estarem confinadas em regiões que sofreram tais dinamismo geológicos, estas espécies tornam-se táxons chave para a investigação dos efeitos dos eventos geológicos, como captura de cabeceiras, na história evolutiva, relações filogenéticas e na atual distribuição do grupo. Os estudos com relação à biogeografia das espécies de peixes neotropicais associadas a eventos geológicos ainda é pouco investigada. Em *Isbrueckerichthys*, a taxonomia morfológica tradicional possui limitações com relação à identificação e delimitação das espécies, os dados citogenéticos disponíveis não possuem nível de resolução para a distinção entre as espécies, e os dados de identificação molecular ainda são escassos. Neste sentido, o presente estudo teve o objetivo de inferir a história evolutiva de *Isbrueckerichthys* em tributários na costa sul/sudeste brasileira e em rios de terras altas nos planaltos paranaenses, com base em eventos geológicos históricos, sobretudo nos eventos de captura de cabeceiras. Para isso foram realizadas análises de delimitação molecular de espécies para as cinco morfoespécies atualmente reconhecidas para o gênero. Foram realizadas também as análises filogenéticas, análises de filogenias calibradas no tempo e análises populacionais, considerando os níveis de estruturação populacional baseados na distribuição e relação filogenéticas das espécies/populações.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta de material biológico

As coletas dos exemplares de *Isbrueckerichthys* foram realizadas usando um transecto através da distribuição geográfica das espécies entre as localidades do rio Ribeira de Iguape, até riachos pertencentes à Bacia do rio Tibagi, passando pela borda da região do Arco de Ponta Grossa (Figura 1). As localidades de coleta, os números de indivíduos (n) e os números de acesso (*vouchers*) estão resumidos na Tabela I. Os peixes foram coletados sob licença do Ministério do Meio Ambiente e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO: 15117-1). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a regulamentação do Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 29/2016). Os espécimes foram fixados em formol 10% e estocados em álcool 70% para identificação e depósito na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, Paraná, Brasil).



**Figura 1.** Mapa hidrológico do sul e sudeste brasileiro, com ênfase para o estado do Paraná, incluindo as localidades de coleta de cada espécie de *Isbrueckerichthys*. As cores diferentes representam a divisão geológica do estado do Paraná, com ênfase para a divisão entre o Primeiro (marrom claro) e Segundo Planalto (em marrom escuro), conhecido como Arco de Ponta Grossa (Escarpa Devoniana).

**Tabela I.** Localidades de coletas dos indivíduos de *Isbrueckerichthys*, identificação taxonômica  $\alpha$  (morfológica) e os dados de geolocalização

#	Identificação taxonômica $\alpha$	Número de acesso (voucher)	Localidade	N	Dados georreferenciados			
1	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	2376	Rio Açungui, Campo Largo	10	49°12'8,6"O 25°23'9,2"S			
2		2379						
3		2380						
4		2381						
5		2383						
6		2708				Ribeirão Areia, Itaiacoca		49°14'45,8"O 25°13'59,3"S
7		2709						
8		2717						
9		2719						
10		2720						
11	<i>Isbrueckerichthys saxicola</i>	40261	Ribeirão Lindóia, Londrina	2	51°05'24,1"O 23°24'16,6"S			
12		40259						
13	<i>Isbrueckerichthys</i> sp.	2950	Rio Charqueada, Imbaú	5	50°21'18,8"O 24°48'58"S			
14		2951						
15		2952						
16		2953						
17		2961						
18	<i>Isbrueckerichthys calvus</i>	3555	Ribeirão Juruba, Apucarana	5	51°37'0,2"O 23°36'56,2"S			
19		3556						
20		3557						
21		29917						
22		29918						

### 3.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de amostras de tecido do fígado usando o método com CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) de (MURRAY; THOMPSON, 1980) com modificações ou, com o emprego do *kit* de extração *Illustra Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit – GE Healthcare*, segundo as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram suspensas em água miliQ e estocadas a 4 °C. Depois da extração, a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% e as amostras foram quantificadas usando espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare).

Para a análise do fragmento mitocondrial foram amplificados fragmentos correspondentes à região Folmer (FOLMER et al., 1994, HEBERT et al., 2003) do gene

citocromo c oxidase subunidade I (COI ou COXI). A amplificação foi realizada utilizando os *primers* FISH\_F1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' como *forward* e FISH\_R1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' como *reverse* (WARD et al., 2005). A reação de PCR consistiu de 1× Taq reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 μM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 μM *primers* e 100 ng mL<sup>-1</sup> de amostra de DNA. O programa de PCR consistiu em um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com 3 passos, sendo o primeiro passo a 94 °C por 30 segundos, o segundo passo a 54 °C por 1 minuto para emparelhamento dos *primers* e o terceiro passo a 72 °C por 1 minuto, com um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos.

O resultado da PCR foi verificado em gel de agarose a 1% pretendo bandas únicas entre 600 e 700 pares de bases. Os produtos de PCR foram purificados usando o *kit Gel Band Purification* (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram submetidos a sequenciamento utilizando 60 ng/μL de produto de PCR e 10 pmol de cada *primer*, através de sequenciador ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

### 3.3 Análises moleculares e populacionais

Cada sequência foi analisada separadamente, alinhando as sequências *forward* e *reverse* (complemento), sendo obtida uma sequência consenso, considerando a qualidade do eletroferograma e usando a ferramenta BLAST (BLASTn) do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências foram verificadas para a possível ocorrência de erros de alinhamento ou *stop codons* internos.

Além disso, sequências de COI de *Isbrueckerichthys* armazenadas em bancos de dados, como Genbank e BOLD (Barcode of Life Data Systems) foram selecionadas e incluídas na análise (Tabela II). Todas as sequências (as originais mais as mineradas) foram alinhadas usando o *software* ClustalW (LARKIN et al., 2007) em modo *default*.

O alinhamento foi submetido a um teste para identificação do melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos no JModeltest (DARRIBA et al., 2012), usando o critério de Informação de Akaike corrigido (AICc) (BOZDOGAN, 1987).

A matriz de alinhamento foi submetida a investigação de estatísticas moleculares no MEGA7 (KUMAR et al., 2016). Inferências de índices de distância genética e árvores de *neighbor-joining*, usando 1000 replicações de *bootstrap*, foram realizadas no MEGA7 (KUMAR et al., 2016), utilizando o melhor modelo evolutivo de substituição previamente estabelecido.

As análises filogenéticas de máxima verossimilhança foram realizadas utilizando o programa PhyML (GUINDON et al., 2010). Os valores de *bootstrap* foram utilizados para o suporte de ramo (FELSENSTEIN, 1985).

Árvores ultramétricas foram inferidas usando o relógio molecular relaxado e não correlacionado (*uncorrelated relaxed clock*), com distribuição lognormal, as taxas de evolução foram consideradas não ligadas, com distribuição lognormal entre as linhagens. As árvores ultramétricas usando o *priors* para *Yule, Birth and Death* e *Coalescent* foram inferidas no *software* BEAST v.1.8.4. (DRUMMOND et al., 2012). Cada análise, considerando os diferentes *priors* foram obtidas independentemente, usando 100.000.000 de gerações de Monte Carlo via Cadeias de Markov (Markov Chains of Monte Carlo). Estatísticas de probabilidade marginal foram estimadas para cada um dos *priors* independentemente no *software* Tracer v.1.6. (RAMBAUT et al., 2014) e TreeAnnotator. Para cada árvore os valores de *burn-in* apropriados foram considerados, descartando as gerações antes da cadeia atingir a fase assintota. As árvores foram sumarizadas utilizando critério de credibilidade máxima de clado (*maximum clade credibility*) para a topologia com uma medida credibilidade dos ramos com o TreeAnnotator v.1.8.4. (DRUMMOND et al., 2012).

Os *softwares* acessórios Tracer e TreeAnnotator foram utilizados para se analisar as estatísticas de estabilidade de cadeia e tamanho efetivo populacional (*effective sample size* – ESS) e a taxa de *burn-in* estipulada foi de 10%.

A investigação da delimitação de espécie através de GMYC (*Generalized Mixed Yule-Coalescent*) foi realizada utilizando o pacote R R Core Team (2013) usando o pacote *SPLITS* (*SPecies LIimits by Threshold Statistics*) (<http://r-forge.r-project.org/projects/splits>).

Para as análises populacionais foram estimados os valores de diversidade haplotípica ( $h$ ), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e fluxo gênico no DNAsp (ROZAS et al., 2017). Valores de estatísticas  $\Phi_{ST}$  (HOLSINGER; WEIR, 2009) e Análises de Variância

Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) foram obtidas no *software* Arlequin (EXCOFFIER; LISCHER, 2015).

Análises de estruturação bayesianas das sequências assumindo uma estruturação baseada no modelo geológico foram realizadas utilizando o programa STRUCTURE (PRITCHARD, 2010). Redes haplotípicas foram construídas utilizando o critério de *median-joining* no *software* NETWORK (<http://www.fluxus-engineering.com>) e PopArt (LEIGH; BRYANT, 2015). A correlação entre a distribuição geográfica e a distância genética entre as sequências foi obtida do *software* Alleles in Space (MILLER, 2005). Também foi realizada uma análise de *Bayesian Skyline Plot* (BSP) (DRUMMOND et al., 2005) utilizando o BEAST.

Uma filogenia calibrada no tempo geológico foi construída utilizando a inferência Bayesiana com o *prior* que apresentou melhor resultado no teste de comparação de modelos, usando programa BEAST (DRUMMOND et al., 2012), com relógio no modelo “relaxado não correlacionado” (DRUMMOND et al., 2006). Foram utilizadas 100.000.000 de gerações de Monte Carlo via Cadeias de Markov. Uma árvore consenso foi obtida a cada 1000 gerações, e a topologia final representa um consenso de todas as árvores amostradas.

Para a calibração de tempo foram utilizadas três tempos de calibração diferentes com a adição de *Otocinclus vittatus* com uma idade de aproximadamente 49.9 milhões de anos, *Pareiohina carrancas* com aproximadamente 45.9 milhões de anos e *Kronickthys heylandi* com aproximadamente 13.0 milhões de anos, baseado nas análises prévias de Roxo et al., (2012; 2014).



**Tabela II.** Tabela contendo as sequências de COI mineradas de bancos de dados e seus respectivos números de acesso

#	Espécies ( $\alpha$ taxonomia)	Número de acesso	Origem
1	<i>I. alipionis</i>	BOLD ANGF8438-12 2	BOLD systems
2		BOLD MCP 44226	BOLD systems
3		BOLD GBGCA326-10 2	BOLD systems
4		BOLD LBP7373	BOLD systems
5	<i>I. epakmos</i>	BOLD ANGBF8379-12 2	BOLD systems
6		BOLD GBGCA331-10 2	BOLD systems
7		BOLD LB7385 1	BOLD systems
8	<i>I. duseni</i>	BOLD ANGBF8437-12 2	BOLD systems
9	<i>I. saxicola</i>	BOLD LBP-29763	BOLD systems
10		BOLD LBP-29995	BOLD systems
11		BOLD LBP-29996	BOLD systems
12		BOLD LBP-29764	BOLD systems
13		BOLD LBP-40263	BOLD systems
14		BOLD LBP-40260	BOLD systems
15		BOLD LBP-29994	BOLD systems
16		BOLD LBP-40261	BOLD systems
17		BOLD LBP-40259	BOLD systems
18		BOLD LBP-29767	BOLD systems
19	<i>I. calvus</i>	BOLD ANFGBF8380-12 1	BOLD systems
20		BOLD GBGCA330-10 1	BOLD systems
21		BOLD LBP6389	BOLD systems

## 4. Resultados

Os resultados estão organizados em capítulos referentes aos artigos científicos (já formatados nas normas das revistas):

**4.1. Capítulo 1: Análise de *DNA barcoding* revela uma discordância entre a identificação morfológica e molecular de espécies de *Isbrueckerichthys* (Siluriformes: Loricariidae)**

**4.2. Capítulo 2: Filogeografia molecular de *Isbrueckerichthys* (Siluriformes: Loricariidae): uma análise baseada em eventos geológicos históricos**

## **CAPÍTULO 1**

**Análise de *DNA barcoding* revela uma discordância entre a identificação morfológica e molecular de espécies de *Isbrueckerichthys* (Siluriformes: Loricariidae)**

**RESUMO**

*Isbrueckerichthys* foi proposto por Derijst (1996) inicialmente com três espécies: *Isbrueckerichthys duseni*, *Isbrueckerichthys alipionis* e *Isbrueckerichthys epakmos*, limitados à bacia do Rio Ribeira de Iguape nas regiões costeiras do Atlântico. Posteriormente, duas espécies distribuídas nas porções mais altas das bacias do Alto Paraná (Bacia do Rio Tibagi) foram descritas: *Isbrueckerichthys saxicola* e *Isbrueckerichthys calvus*. Neste estudo foram realizadas análises de identificação molecular destas espécies comparadas com identificações morfológicas (alfa taxonomia x beta taxonomia). *I. saxicola* e *I. calvus* apresentam uma distância genética K2P abaixo de 2% ( $1,32\% \pm 0,022\%$ ) e podem ser consideradas em um como sendo a mesma categoria taxonômica. *I. saxicola* e *I. calvus* se agrupam em um mesmo ramo nas árvores filogenética inferidas através de análise bayesiana. A análise de *Generalized Mixed Yule-Coalescent* (GMYC) também recomenda que *I. calvus* e *I. saxicola* representam a mesma espécie. Todas estas evidências não oferecem suporte à existência de *I. calvus* com o status taxonômico de espécies e sugerem a sinonímia de *I. calvus* como *I. saxicola*. Esta inconsistência no suporte de *I. calvus* pode ter se originado dos caracteres morfológicos utilizados para a discriminação e diferenciação das duas espécies são sutis e com alto grau de homoplasia como, por exemplo, o número de odontódeos nas placas abdominais. Ou ainda pode ser atribuída à diversificação recente, ao processo de *incomplete lineage sorting* ou à falta de divergência. Análises integrativas com relação a outros caracteres podem ser necessárias, uma vez que a presente análise representa uma abordagem de *locus* único.

**Palavras-chave:** GMYC, sinonímia, sistemática, taxonomia integrativa.

## ABSTRACT

*Isbrueckerichthys* were first proposed by Derijst (1996), describing three species: *Isbrueckerichthys duseni*, *Isbrueckerichthys alipionis* and *Isbrueckerichthys epakmos* from the Ribeira de Iguape basin in lowlands of the Atlantic coastal basins. Posteriorly two species occurring in the uplands of the Upper Paraná river drainage (Tibagi basin) were described: *Isbrueckerichthys saxicola* and *Isbrueckerichthys calvus*. For this purpose, we compared chromosomal markers and sequences of COI region associate with barcoding molecular identification to investigate the molecular identities of the species occurring in the inlands of Upper Paraná basin (i.e., *I. saxicola* and *I. calvus*) an its species validation. The chromosomal data no show differences among *I. duseni*, *I. saxicola* and *I. calvus*, corroborating to hypothesis of recent diversification of the group. Our data show also that *I. saxicola* and *I. calvus* grouping in phylogenetic trees and, shown a genetic distance of 1,32% ( $\pm 0,0022$ ) a value below 2 %, a threshold established for fishes, indicating an incongruence between morphological and molecular species delimitation procedures for *Isbrueckerichthys*. These two species were described based only considering morphological differences like the number of odontodes in abdominal platelets, among others, and no molecular evidence were inferred until the present. However, the discordance between molecular and morphological species may due to recent diversification of these and processes of incomplete lineage sorting or lacking divergence. Integrative analysis regarding other characters may be helpful, once the molecular data presented here considered a single locus approach and put *I. calvus* in synonym to *I. saxicola*.

**Key words:** Karyotypic Evolution, GMYC, synonym, systematics, integrative taxonomy

## INTRODUÇÃO

Limitações de sistemas de identificação baseados unicamente em morfologia levam à necessidade de novas abordagens para o reconhecimento de táxons. A primeira destas limitações de um sistema baseado exclusivamente em morfologia é a plasticidade fenotípica e a variabilidade genética nos caracteres que podem levar a identificações errôneas (HEBERT et al., 2003). Um sistema baseado estritamente na morfologia leva à subestimação da diversidade de espécies crípticas, as quais são comuns em muitos grupos (KNOWLTON, 1993, JARMAN; ELLIOTT, 2000; HEBERT et al., 2003). Além disso, os sistemas morfológicos são, geralmente, restritos a apenas um estágio de vida ou específico a um sexo, o que dificulta a identificação de indivíduos que estão fora dessas características (HEBERT et al., 2003).

Nas últimas décadas, com o avanço de técnicas moleculares e no processo de sequenciamento de DNA, diversos marcadores moleculares, como por exemplo, sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) foram combinados com metodologias morfológicas para a identificação de espécies e para o reconhecimento da biodiversidade (BICKFORD et al., 2007). Hebert et al. (2003) propuseram uma metodologia conhecida como *DNA barcoding*, que estabelece e padroniza um método efetivo e rápido para a identificação de espécies utilizando sequências de DNA. Estudos realizados até o momento mostram uma alta taxa de resolução de identificação molecular usando a técnica de *DNA barcoding* para diferentes organismos (HEBERT et al., 2003; WARD et al., 2005).

Para os animais, o mtDNA melhor se adequa em relação ao DNA nuclear (nDNA) aos propósitos de identificação molecular através da técnica de *DNA barcoding*. Esta melhor adequação se dá, de maneiras gerais, ao fato do mtDNA não possuir *introns*, apresentar taxa limitada ou não possuir eventos de recombinação, e deter herança haploide (SACCONE et al., 1999). Dentre os genes mitocondriais, o gene para citocromo c oxidase subunidade I (COI ou COX1) é um destaque para o uso em identificação molecular (IVANOVA, 2007; WARD et al., 2005). O COI apresenta uma taxa alta de sinal filogenético e possui *primers* universais que amplificam a região para uma ampla gama de diferentes organismos (FOLMER et al., 1994; IVANOVA, 2007; WARD et al., 2005), tornando-o um excelente marcador a nível específico.

Estudos prévios estipulam parâmetros para valores de padronização quanto a divergência genética para marcadores moleculares utilizados na identificação molecular de espécies. Para vários autores, a divergência interespecífica deve ser dez vezes maior do que a divergência intraespecífica para a validação do táxon (HEBERT et al., 2004; WARD, 2009). Em peixes foi proposto, que espécimes estritamente relacionadas com distância genética acima 2% provavelmente pertencem a espécies diferentes (WARD, 2009). April et al. (2013) propuseram que indivíduos com valores de divergência genética acima de 2% são, geralmente, incompatíveis sexualmente. Embora os valores de divergência genética associados aos marcadores moleculares utilizados com o propósito de identificação molecular sejam padronizados para alguns organismos, é conhecido que alguns valores de limítrofes para as divergências intra/interespecíficas são variáveis, e são influenciados pela variação na taxa de substituição de nucleotídeos entre as linhagens (BARRACLOUGH et al., 2009).

Novas abordagens para a delimitação do número de espécies baseados em uma análise *single locus*, além da diversidade genética, foram desenvolvidos nas últimas décadas. Um exemplo é a técnica de *Generalized Mixed Yule-Coalescent* (GMYC) (PONS et al., 2006). Este método tem se destacado na delimitação de espécies em análises de dados provenientes de *single locus*, e foi também utilizado em estudos filogenéticos e de reconhecimento de diversidade em diferentes grupos pouco conhecidos de organismos (BARRACLOUGH et al., 2009, MONAGHAN et al., 2009, MARSHALL et al., 2011, VUATAZ et al., 2011, ROXO et al., 2015). O método de GMYC considera as premissas que as mutações ocorrem independentemente e, estas mutações que surgem em uma espécie não podem se propagar imediatamente para outra (DE QUEIROZ, 2007). Abordagens integrativas representam uma estratégia para se investigar questões em que dados de origem única revelam-se menos conclusivos do que aqueles baseados em dados de origem diversas para se detectar a riqueza de espécies dentro de táxons supostamente homogêneos (PADIAL et al., 2010; SCHLICK-STEINER et al., 2010, GRKOVIĆ et al. 2017). Recentemente, alguns estudos utilizaram-se da junção de dados moleculares com análises citogenéticas para delimitação de espécies em peixes neotropicais (SANTOS et al., 2019; do NASCIMENTO et al., 2018).

*Isbrueckerichthys* (Loricariidae: Siluriformes) reúne espécies de pequeno porte de cascudos (*armored catfishes*) e é distinto de táxon irmão *Neoplecostomus* por uma junção de caracteres morfológicos diagnósticos (DERIJST, 1996). A primeira descrição das

espécies ocorreu nos planaltos costeiros do Atlântico, restritos à bacia do Rio Ribeira de Iguape, sendo elas: *Isbrueckerichthys dusei*, *Isbrueckerichthys alipionis* e *Isbrueckerichthys epakmos*. Posteriormente, Jerep et al. (2006) descreveram duas espécies nos planaltos das terras mais altas do escudo cristalino brasileiro associados à bacia do Rio Tibagi, pertencente a bacia do Alto Rio Paraná: *Isbrueckerichthys saxicola* e *Isbrueckerichthys calvus*. No entanto, estas duas espécies possuem poucos e sutis caracteres, que podem gerar identificações errôneas entre *I. saxicola* e *I. calvus*. São ausentes as análises de delimitação molecular de espécies para *Isbrueckerichthys* e descrições citogenéticas são restritas para *I. dusei*, que possui  $2n=54$  cromossomos (20m+20sm+14st), com poucos blocos heterocromáticos e sintenia entre os sítios de 5S e 45S rDNA (ZIEMNICZAK et al., 2012).

Devido à problemática relacionada ao reconhecimento a nível específico de diferenciação entre *I. saxicola* e *I. calvus*, ambas distribuídas em diferentes subafluentes da bacia do Rio Tibagi, o objetivo deste trabalho foi investigar a delimitação de espécies para *Isbrueckerichthys* usando análises de identificação molecular.



## MATERIAL E MÉTODOS

### *Coleta das amostras*

As espécies de *Isbrueckerichthys* foram coletadas na área de distribuição geográfica limítrofe ao Arco de Ponta Grossa, nos rios costeiros pertencentes à bacia do Rio Ribeira de Iguape e nos riachos pertencentes à Bacia do Rio Tibagi das terras “altas” pertencentes ao escudo cristalino (Alto Paraná). As coletas foram realizadas priorizando rios de profundidade de média a rasa, com alta concentração de oxigênio, com correnteza de leve a moderada e com pedras soltas no fundo. Os peixes foram coletados sob licenças do Ministério do Meio Ambiente e do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO: 15117-1). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso Animal (Processo CEUA 028/2016) da Universidade Estadual de Ponta Grossa. As amostras foram fotografadas e depositadas no Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, Brasil.

### *Extração de DNA e sequenciamento*

A extração de DNA genômico foi realizada através de amostras do fígado usando o método com CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) de (MURRAY; THOMPSON, 1980). Depois da extração, a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% e as amostras foram quantificadas usando espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare). O DNA genômico foi utilizado para amplificação de fragmentos do COI utilizando os *primers* FISHF1 e FISHR1 (WARD et al., 2005). A reação de PCR consistiu de 1× Taq reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40 μM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.2 μM *primers* e 100 ng mL<sup>-1</sup> de amostra de DNA. O programa de amplificação consistiu de um passo inicial de desnaturação por 2 minutos a 94 °C, seguidos de 35 ciclos com 3 passos sendo o primeiro a 94 °C por 30 s, o Segundo a 54 °C por 1 minuto, e o terceiro a 72 °C por 1 minuto e um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos. O resultado da PCR foi verificado em

eletroforese em gel de agarose a 1% onde bandas únicas entre 600 e 700 pares de base foram observadas. Os produtos de PCR foram purificados usando o *kit Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram submetidos a sequenciamento usando sequenciador ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### ***Análises moleculares de identificação e delimitação de espécies***

Sequências de COI de *Isbrueckerichthys* disponíveis em bancos de dados, como Genbank e BOLD (*Barcode of Life Data Systems*) foram minerados e incluídos na análise. Todas as sequências foram alinhadas usando o *software* ClustalW (LARKIN et al., 2007), com parâmetros em modo *default*. O alinhamento foi inspecionado manualmente para a existência de inserções, deleções ou *stop codons* internos. O alinhamento foi submetido a investigação de estatísticas moleculares e para a procura do melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos no MEGA7 (KUMAR et al., 2016). Índices de distância genética e árvores de neighbor-joinig, usando 1000 replicações de *bootstrap*, foram realizadas no MEGA7 (KUMAR et al., 2016) aplicando o melhor modelo evolutivo de substituição previamente estabelecido. Todas as sequências obtidas neste estudo estão resumidas na Tabela I, e as sequências mineiradas estão resumidas na Tabela II.

As sequências de COI obtidas originalmente para este estudo foram submetidas à identificação por *DNA barcoding* na ferramenta de identificação no BOLD ([http://www.boldsystems.org/index.php/IDS\\_IdentificationRequest](http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_IdentificationRequest)), através do alinhamento global entre as sequências alvo e as sequências depositadas no banco de dados.

Árvores ultramétricas foram inferidas usando o relógio molecular relaxado e não correlacionado (*relaxed random molecular clock*) com distribuição lognormal. As taxas de evolução foram consideradas não ligadas, com distribuição lognormal entre as linhagens. As árvores ultramétricas usando o *priors* para *Yule, Birth and Death* e *Coalescent* foram inferidas no *software* BEAST v.1.8.4. (DRUMMOND et al., 2012). Cada análise, considerando os diferentes *priors* foram obtidos independente, usando 100.000.000 de gerações de Monte Carlo via Cadeias de Markov (*Markov Chains of*

*Monte Carlo*). Estatísticas de probabilidade marginal foram estimadas para cada um dos *priors* independentemente no *software* Tracer v.1.6. (RAMBAUT et al., 2014) e TreeAnnotator. Para cada árvore os valores de *burn-in* apropriados foram considerados, descartando as gerações antes da cadeia atingir a fase assintota. As árvores foram sumarizadas utilizando critério de credibilidade máxima de clado (*maximum clade credibility*) para a topologia com uma medida credibilidade dos ramos com o s v.1.8.4. (DRUMMOND et al., 2012). Para a investigação de GMYC foram realizadas análises utilizando o pacote R R Core Team (2013) usando o pacote SPLITS (SPecies LImits by Threshold Statistics) (<http://r-forge.r-project.org/projects/splits>).

## RESULTADOS

O alinhamento final contendo 43 sequências para as quatro espécies de *Isbrueckerichthys* contém 478 pares de base onde 132 sítios foram informativos para parcimônia e 255 invariáveis. O melhor modelo evolutivo de substituição encontrado foi o de K2P (KIMURA, 1980) com distribuição gama, com valor de Critério de Correção de Akaike corrigido (*Akaike Information Criterion corrected*) de 6100.4494. A divergência genética de K2P variou de 1,32% ( $\pm 0,022\%$ ) até 8,05% ( $\pm 0,091\%$ ) (Tabela III). Considerando apenas *I. calvus* e *I. saxicola* a divergência genética observada foi de 1,32% ( $\pm 0,022\%$ ) (Tabela III). As árvores de *neighbor-joining* e bayesianas (consenso) sugerem a monofilia de *Isbrueckerichthys* com base no conjunto escolhido como grupo externo (*Pareiohina carrancas*, *Hypostomus paulinus* e *Neoplecostomus microps*) (Figuras 2 e 3). As sequências não apresentaram inserções, deleções ou *stop codons* no seu interior. A frequência nucleotídica foi de 25% tanto para A, C, T quanto para G. O fator de Bayes para a árvore usando o *prior* de *Yule* foi de -1925.93 ( $\pm 1.28$ ), para *Birth and Death* foi de -2140.3054 ( $\pm 1.25$ ) e para o processo *Coalescent* foi de -1984.62 ( $\pm 1.08$ ). O teste de comparação do modelo no Tracer mostra que o melhor modelo entre os três diferente *priors* foi o modelo *Birth and Death* com valor de AICM de 3501.41 ( $\pm 0,053$ ). Todos os valores para os tamanhos efetivos populacionais (ESS) para todas as análises apresentaram valores acima de 200.

Os resultados de identificação molecular  $\beta$ , obtidos através da ferramenta de identificação por similaridade no *BOLD systems*, confrontados com a identificação morfológica  $\alpha$  estão resumidos na Tabela IV. Para *Isbrueckerichthys duseni*, *Isbrueckerichthys calvus* e *Isbrueckerichthys saxicola* todas as identificações morfológicas  $\alpha$  são congruentes com os resultados para a identificação molecular  $\beta$ . Os indivíduos identificados morfológicamente como *Isbrueckerichthys sp.* do Rio Charqueada foram identificados molecularmente como *Isbrueckerichthys calvus/saxicola*.

A análise de *neighbor-joining* e bayesiana evidenciou que *Isbrueckerichthys duseni* formaram um clado distinto com uma divisão entre exemplares do ribeirão Areia (Itaiacoca) e; outro com indivíduos do rio Açungui (Campo Largo). Em outro clado indivíduos de *I. saxicola* e *I. calvus* mostraram uma mistura tanto nas topologias de

*neighbor-joining*, usando as distâncias genéticas *a priori*, e as topologias das análises bayesianas (Figuras 2 e 3).

## DISCUSSÃO

Os representantes de *Isbrueckerichthys* são identificados por poucos e sutis caracteres morfológicos (PEREIRA e OYAKAWA, 2003; JEREP et al., 2006) e este fator leva a questionamentos sobre as unidades como espécies. A diversidade genética evidenciada neste estudo demonstrou uma distância genética K2P baixa, em torno de 2-3% entre as espécies *I. epakmos*, *I. duseni*, *I. saxicola* e *I. calvus*. A exceção ficou para *I. alipionis*, a qual detém distância genética K2P ~8% em relação aos congêneres. Entretanto, quando considerado apenas *I. saxicola* e *I. calvus*, a distância genética foi de 1,32% ( $\pm 0,22\%$ ), abaixo do valor limite de divergência de 2% para delimitação de espécies para peixes proposto por Ward (2009). Alguns peixes neotropicais já foram demonstrados serem entidades taxonômicas distintas com distâncias genéticas inferiores a 2%, porém, com os representantes da unidade agrupados em ramos reciprocamente monofiléticos (BELLAFRONTTE et al., 2013). No presente estudo *I. saxicola* e *I. calvus*, além da baixa divergência genética são estreitamente relacionadas e agrupam-se em um único ramo monofilético tanto nas árvores de *neighbor-joining* quanto na de inferência bayesiana, indicando um provável fluxo gênico entre seus representantes nos diferentes tributários da bacia do rio Tibagi.

*Isbrueckerichthys saxicola* e *Isbrueckerichthys calvus* foram descritos na bacia do rio Tibagi por Jerep et al. (2006), e são diferenciados dos demais congêneres por caracteres morfológicos: dentes bicúspides, odontódeos hipertrofiados e espinho mais longo na nadadeira peitoral. Já as diferenças morfológicas diagnósticas entre *I. calvus* e *I. saxicola* são: (i) o número de odontódeos nas plaquetas abdominais, onde são encontrados um número  $\geq 6$  para *I. saxicola* e  $\leq 5$  *I. calvus*; (ii) pela presença/ausência de uma área achatada na porção inferior das duas primeiras placas da linha lateral e; (iii) pelo grau de exposição do cleithrum e pelo grau de convexidade e exposição do plano supraoccipital. Embora a descrição de Jerep et al. (2006) seja bem detalhada, a divergência morfológica não é acompanhada por uma divergência genética capaz de dar sustentação para a divisão dos táxons.

Em um outro estudo, uma análise citotaxonômica utilizando marcadores citogenéticos mostrou que as espécies de *I. duseni*, *I. saxicola*, *I. calvus* possuem estruturas cromossômicas similares, com pequenas variações nas fórmulas cariotípicas e

na distribuição dos blocos heterocromáticos, (BARROS, 2016). Os dados obtidos por Barros (2016) não foram resolutivos para a delimitação e identificação destas espécies, o que poderia, em parte, ser explicado pelo baixo nível de variação em marcadores cromossômicos de espécies que diversificaram recentemente.

Assim como na análise do valor limítrofe de divergência genética, a análise de GMYC também aponta para a evidência de que, no âmbito molecular, *I. calvus* e *I. saxicola* pertencem à mesma categoria taxonômica (LR test. 0.01887004; threshold time: -4, 9 ML clusters, 5-10, e 11 entidades ML). Ribeiro (2006) propôs a ocorrência de fauna inclusiva, i.e., a mistura de fauna entre as bacias adjacentes com influência costeira, como o Rio Ribeira de Iguape, e os de terras elevadas como o Rio Tibagi, devido a eventos geológicos pretéritos e captura de cabeceiras de rios. Representantes de Neoplecostominae detêm características de habitar cabeceiras de rios e apresentam baixa vagilidade, o que os tornam alvos durante eventos de capturas de rios. Nesta mesma via, alguns estudos consideram a ocorrência de espécies que divergiram recentemente no sistema hidrográfico do Alto Rio Paraná a partir da representantes da bacia costeira, como é o caso de *Isbrueckerichthys* ocorrentes no rio Tibagi (ROXO et al., 2012, 2014). Nosso conjunto de dados mostra um único ramo monofilético contendo uma mistura dos táxons nominais *I. calvus* e *I. saxicola* e, sugerem fluxo gênico entres estes representantes ao longo dos tributários no rio Tibagi.

O conjunto de dados obtidos para *I. calvus* e *I. saxicola* neste estudo pode indicar um estágio intermediário de especiação (especiação incipiente) devido ao curto período de tempo para a diversificação, após a linhagem dispersar para a bacia do rio Tibagi, estimada em cerca de 8-12 milhões de anos (ROXO et al., 2012, 2014). A proposição de sinonímia entre *I. calvus* e *I. saxicola* ganha reforço nos dados das análises integrativas para as espécies *I. alipionis*, *I. epakmos* e *I. duseni*. Estas espécies, embora simpátricas à bacia do rio Ribeira de Iguape (PEREIRA; OYAKAWA, 2003), demonstraram delimitação molecular compatível com táxons válidos.

Análises integrativas entre investigações morfológicas e moleculares devem ser levadas em conta para estudos de delimitação de espécies, uma vez que representam abordagens complementares que podem ser úteis para a filogenia, sistemática, evolução e filogeografia do grupo. Respostas dicotômicas para grupos com diversificação recente ainda são um desafio para a taxonomia integrativa. *Isbrueckerichthys* ocorrentes no Alto Paraná tem uma proposta para sua origem pela dispersão através de eventos de captura

de cabeceiras entre as regiões costeiras e as regiões mais elevadas da borda do escudo cristalino (RIBEIRO, 2006, ROXO et al., 2012, 2014). Esta proposta ganha força pela baixa divergência cromossômica e molecular entre espécies de *I. duseni* das regiões costeiras e seus pares, *I. saxicola* e *I. calvus*, que ocorrem nas porções elevadas do escudo cristalino associado à bacia do Rio Tibagi. As análises moleculares deste estudo demonstram espaço de tempo relativamente curto para divergência e não sustentam a ocorrência da espécie morfológica *I. calvus*, que pode corresponder ao sinônimo júnior *I. saxicola*.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Ministério do Meio Ambiente/Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/MMA/SISBIO nº: 15117) pela autorização para a coleta de material biológico. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI), e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Fundação Araucária).



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

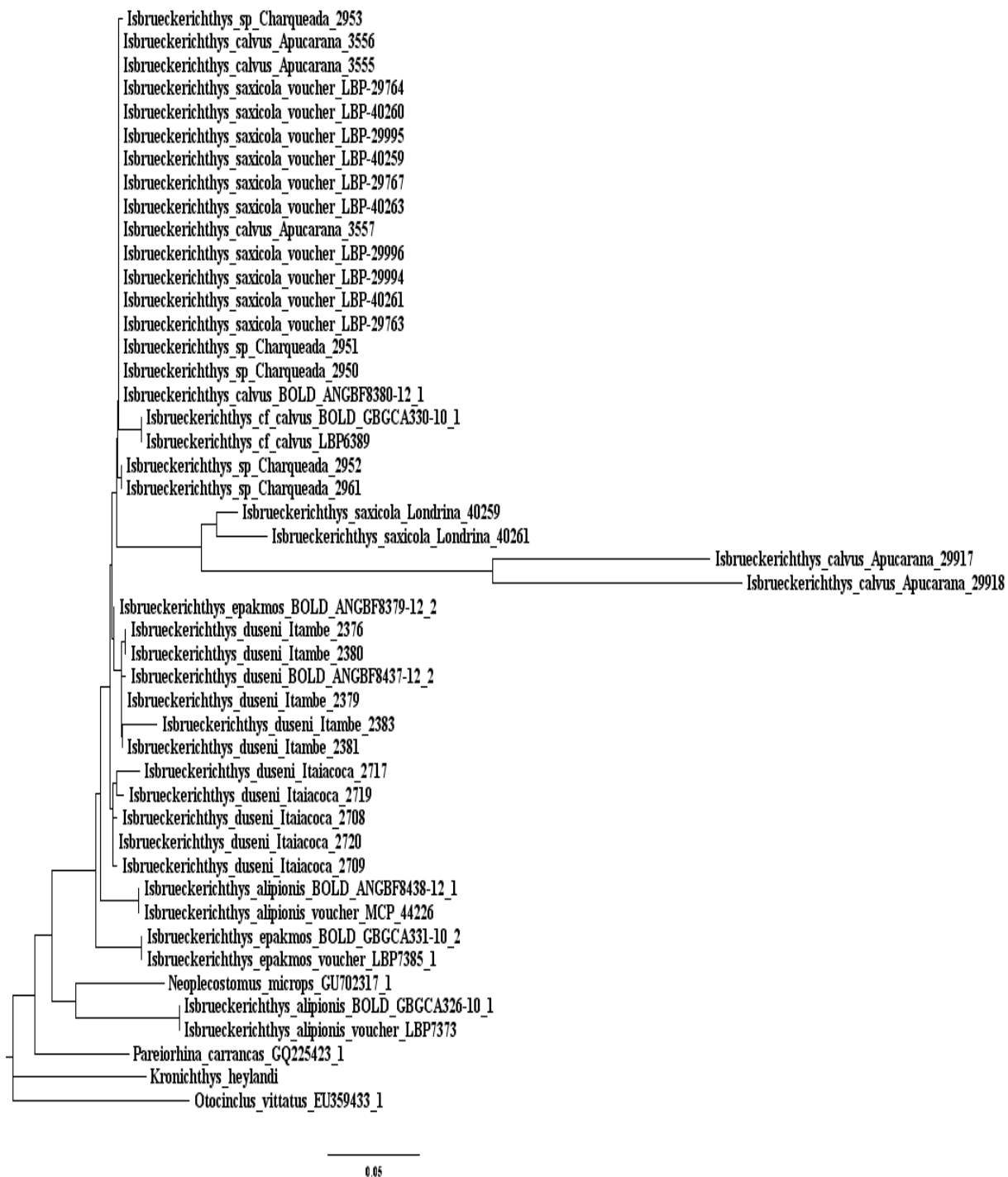
As referências bibliográficas encontram-se no final da tese, na seção 5.

**Tabela III.** Tabela contendo as distâncias genéticas entre os grupos de *Isbrueckerichthys* e o desvio padrão usando o modelo evolutivo de substituição K2P+G.

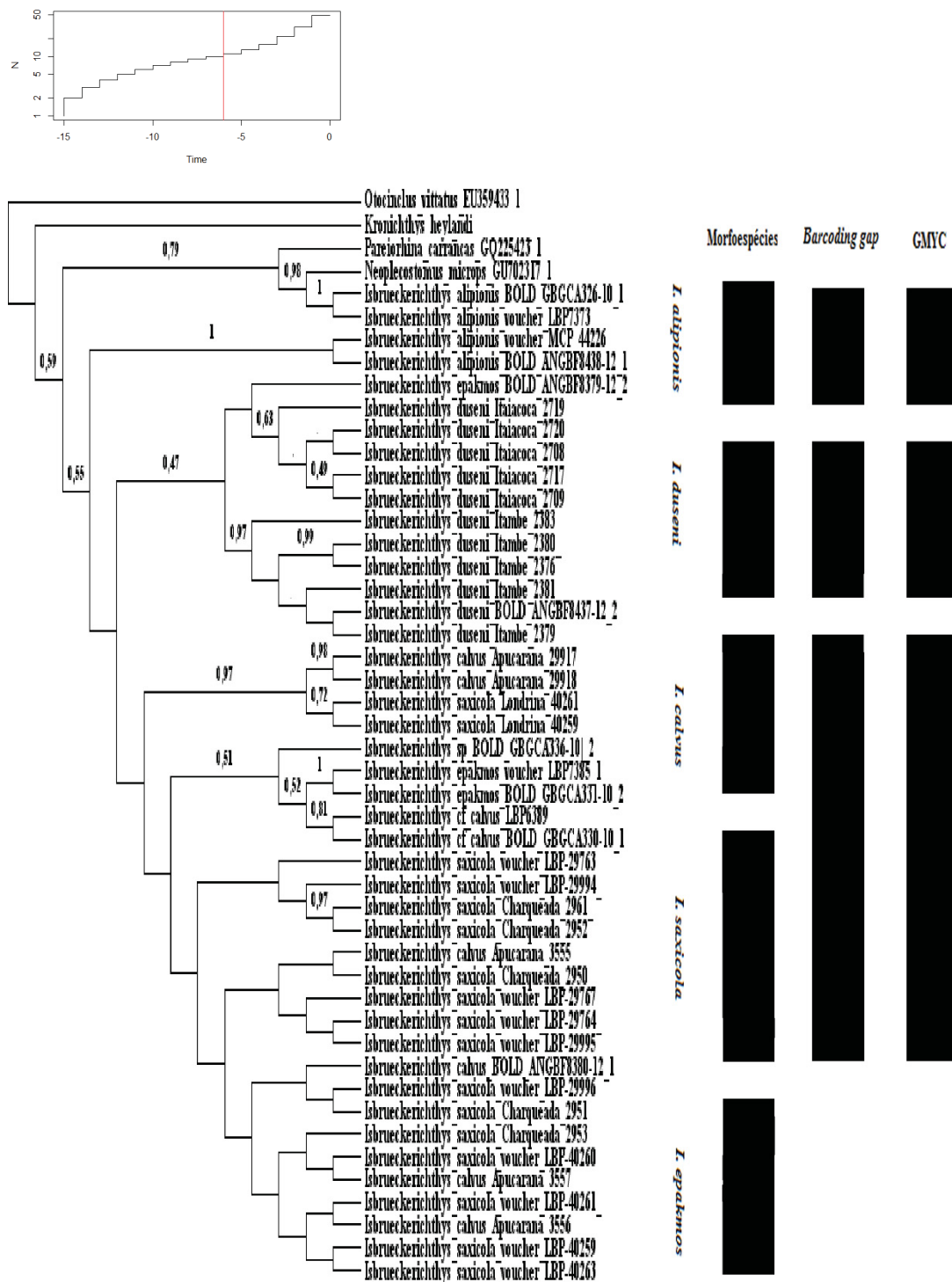
	<i>I. alipionis</i>	<i>I. saxicola</i>	<i>I. calvus</i>	<i>I. duseni</i>	<i>I. epakmos</i>
<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>					
<i>Isbrueckerichthys saxicola</i>	0,0801 (±0,0091)				
<i>Isbrueckerichthys calvus</i>	0,0712 (±0,0089)	<b>0,0132</b> <b>(±0,0022)</b>			
<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	0,0746 (±0,0088)	0,0211 <b>(±0,0038)</b>	<b>0,0164</b> <b>(±0,0038)</b>		
<i>Isbrueckerichthys epakmos</i>	0,0805 (±0,0091)	0,0366 (±0,0063)	0,0269 (±0,0057)	0,0299 (±0,0055)	
<b>Intraespecífica</b>	<b>0,0738</b> <b>(±0,0103)</b>	<b>0,0174</b> <b>(±0,0028)</b>	<b>0,0067</b> <b>(±0,0026)</b>	<b>0,0125</b> <b>(±0,0027)</b>	<b>0,023</b> <b>(±0,0054)</b>

**Tabela IV.** Resumo das identificações morfológicas  $\alpha$  confrontadas com as identificações moleculares  $\beta$ , obtidas na ferramenta de identificação por similaridade do *BOLD systems*, com a porcentagem de identificação e similaridade de cada identificação.

Número de acesso (voucher)	Identificação taxonômica $\alpha$	Identificação taxonômica $\beta$ (BOLD)	% identificação	% similaridade
2376	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	100	99.59
2379	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	100	99.79
2380	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	100	99.49
2381	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	100	99.49
2383	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	97.7	97.74
2708	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	100	99.79
2709	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	100	99.79
2717	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	98.9	98.90
2719	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	100	99.38
2720	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	100	100
40261	<i>Isbrueckerichthys saxicola</i>	NO MATCH	NO MATCH	NO MATCH
40259	<i>Isbrueckerichthys saxicola</i>	NO MATCH	NO MATCH	NO MATCH
2950	<b><i>Isbrueckerichthys sp.</i></b>	<b><i>Isbrueckerichthys saxicola/calvus</i></b>	100	99.83
2951	<b><i>Isbrueckerichthys sp.</i></b>	<b><i>Isbrueckerichthys saxicola</i></b>	100	100
2952	<b><i>Isbrueckerichthys sp.</i></b>	<b><i>Isbrueckerichthys saxicola/calvus</i></b>	100	99.79
2953	<b><i>Isbrueckerichthys sp.</i></b>	<b><i>Isbrueckerichthys saxicola/calvus</i></b>	100	99.79
2961	<b><i>Isbrueckerichthys sp.</i></b>	<b><i>Isbrueckerichthys saxicola/calvus</i></b>	100	99.49
3555	<i>Isbrueckerichthys calvus</i>	<b><i>Isbrueckerichthys saxicola/calvus</i></b>	100	100
3556	<i>Isbrueckerichthys calvus</i>	<b><i>Isbrueckerichthys saxicola/calvus</i></b>	100	100
3557	<i>Isbrueckerichthys calvus</i>	<b><i>Isbrueckerichthys saxicola/calvus</i></b>	100	100
29917	<i>Isbrueckerichthys calvus</i>	NO MATCH	NO MATCH	NO MATCH
29918	<i>Isbrueckerichthys calvus</i>	NO MATCH	NO MATCH	NO MATCH



**Figura 2.** Árvore de *neighbor-joining* para *Isbrueckerichthys* usando as distâncias genéticas através do modelo evolutivo de K2P+G. Números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* com 1000 replicações.



01  
**Figura 3.** Consenso das três árvores obtidas independentemente para os três diferentes priors para análise bayesiana (*Yule, Birth and Death* e *Coalescent*). Acima o gráfico da análise de *threshold* para GMYC

## **CAPÍTULO 2**

## Filogeografia molecular de *Isbrueckerichthys* (Siluriformes: Loricariidae): uma análise baseada em eventos geológicos históricos

### RESUMO

A distribuição e evolução dos peixes Neotropicais está intimamente ligada à eventos geológicos que promovem a dispersão e interferem no padrão de modelagem da paisagem. Captura de cabeceiras de rios são eventos geológicos que interconectam bacias adjacentes e/ou isolam bacias que eram previamente conectadas, promovendo ao mesmo tempo o isolamento (vicariância) e a dispersão (geodispersão) de espécies de peixes. Os cascudos (Loricariidae) representam bons modelos de estudo para a investigação de eventos de vicariância e dispersão atrelados a eventos geológicos. Na região sul/sudeste do Brasil estas alterações do relevo ocorreram no “Arco de Ponta Grossa” (Escarpa Devoniana) e a história evolutiva dos grupos remete a eventos de intercâmbio de fauna, os quais possuem assinaturas genéticas em populações de peixes. Neste trabalho foi investigado os padrões de distribuição geográfica e de diversidade genética de populações de *Isbrueckerichthys* em regiões limítrofes ao Arco de Ponta Grossa para as bacias dos rios Ribeira de Iguape e Tibagi com objetivo de inferir sobre a história evolutiva e as assinaturas genéticas de eventos geológicos de captura de cabeceiras de rios na diversificação do grupo. Para isto foram utilizadas análises moleculares de variância e de diversidade, inferências filogenéticas e filogeográficas, relógio molecular, além de índices de genética de populações, como  $\Phi_{ST}$ , diversidade haplotípica, rede haplotípica, teste de mantel e análises bayesiana de estruturação. As análises apontam para uma alta diversidade haplotípica ( $h$ ) = 0,859 e diversidade nucleotídica por sítio ( $\pi$ ) = 0,05026. O teste de Mantel aponta para uma forte correlação entre a distribuição geográfica e a diversidade genética. As análises mostraram um cenário onde o ancestral de *Isbrueckerichthys* partiu das bacias costeiras do Atlântico para as terras mais altas em um processo de captura de cabeceira de rios há cerca de 8 (5-12) milhões de anos atrás, e a partir de então vem se diversificando ao longo de sua distribuição. A estruturação das populações segundo as inferências filogenéticas e filogeográficas corresponde a um cenário onde *I. duseni* diverge para *Isbrueckerichthys saxicola* + *I. calvus*. As análises mostraram ainda que *Isbrueckerichthys* sp. do rio Charqueada representa uma transição

entre *I. duseni* da bacia costeira e *I. calvus* e *I. saxicola*. Os resultados confirmam a hipótese de que eventos de captura de cabeceiras na região do Arco de Ponta Grossa contribuíram para o entendimento da diversidade da distribuição de *Isbrueckerichthys* na bacia do rio Tibagi.

**Palavras-chave:** Captura de cabeceiras de rios, diversidade de peixes, diferenciação genética.



## ABSTRACT

Neotropical fishes represent one of the most diverse groups, and their distribution and evolution are intimately linked to geological dispersion events and to patterns of landscape modeling. One important mechanism of geological nature that promotes the dispersion and diversification for fishes is the headwaters capture. These events interconnect adjacent basins and isolated basin that were previously connected, promoting at same time isolation (vicariance) and dispersion (geopersion) of fishes. Loricariidae represents one of the most diverse families in Neotropical fishes and constitute a proper study model for the investigation of events vicariance and geodispersion linked to preterit geological events. In the south and southeast Brazilian regions preterit alterations promoted headwaters capture events and faunal exchange between costal drainages and rivers of the uplands that composed the Brazilian crystalline shield. Ponta Grossa Arch is an important geological barrier for fish distribution and they evolutive history remit to faunal exchange events, that leaves genetic signatures in fish populations that inhabit they extension. In this way, the aim of this work was to investigate the patterns of geographic distribution and genetic diversity in *Isbrueckerichthys* in bordering regions of the Ponta Grossa Arch for the Ribeira de Iguape river and Tibagi river basins and infer about the evolutive history and the genetic signatures of geologic events of headwaters capture in group diversification. For this investigation were utilized analysis of molecular variance and of diversity, phylogenetic inferences, molecular clock and populational diversity indices, as  $\Phi_{ST}$ , haplotypic and nucleotidic, haplotype network, mantel test and bayesian structure attribution tests. The results show a high haplotypic diversity  $h = 0,859$  and nucleotide diversity  $\pi = 0,05026$ . The Mantel test show a strong positive correlation between geographical distance against the genetic diversity. Analysis also shows a scenario where the *Isbrueckerichthys* ancestral reach the upland basins from coastal drainages through headwaters capture event about 8 (5-12) millions of years, and since them were been diversified throughout their distribution. The populations structure according to phylogenetic and phylogeographic points to a scenario where *I. duseni* from costal drainages diverges to and *I. saxicola* and *I. calvus* from upland rivers. The results confirm the hypothesis that

headwaters capture events, like those that originate the Ponta Grossa Arch contributes for diversity found in *Isbrueckerichthys* and for their distribution in the Tibagi river basin.

**Key-words:** Headwaters capture, fish diversity, Genetic differentiation.

## INTRODUÇÃO

Peixes continentais da América do Sul representam cerca de um quinto de espécies de peixes do mundo, ou cerca de 10% de todos os vertebrados (VARI; MALABARBA, 1998; ALBERT et al., 2011). A razão evolutiva e ecológica para a origem e manutenção desta alta diversidade é pouco compreendida, no entanto, para organismos obrigatórios de água doce, eventos de capturas de cabeceira representam um importante processo de alteração da paisagem que pode isolar linhagens e promover a diversificação (WATERS et al., 2006; WINEMILLER, et al. 2008; ALBERT; CRAMPTON, 2010; VICTORIANO et al., 2015), através de mudanças nos padrões na conectividade em bacias adjacentes (SMITH, 1981; MAYDEN, 1988).

Capturas de cabeceiras, ou capturas de rios (do inglês - *headwaters capture, river capture*) são processos geomorfológicos em que parte do fluxo de um córrego ou rio é dividido através das bacias adjacentes, promovendo intercâmbio de fauna (RIBEIRO, 2006). Estas capturas de cabeceiras emergem pela influência de diversos processos geomorfológicos, incluindo o soerguimento tectônico ou *tilting*, represamento pela ação de glaciares ou deslizamento de terra, denudação de bacias de rios ou erosão, ou ainda por avulsão da margem de bacias hidrográficas pela acumulação de sedimentos em leques e estuários (BISHOP, 1995; ALMEIDA; CARNEIRO, 1998; RIBEIRO, 2006; WILKINSON et al., 2006). O processo de erosão de cabeceira ou de tributário lateral de uma bacia hidrográfica tem um efeito de, simultaneamente, separar porções de rios que antes eram conectadas (i.e., vicariância) e então conectar porções de rios que antes eram separadas (i.e., geodispersão). Em outras palavras, capturas de rios promovem a alteração de barreiras físicas de bacias hidrográficas (GRANT et al., 2007; ALBERT; CRAMPTON, 2010).

Para táxons obrigatórios de água doce, como peixes de água doce, os eventos de captura de rios promovem a dispersão de espécies entre bacias adjacentes, onde os limites destas bacias impedem a dispersão (GRANT et al., 2007; MUNEEPEERAKUL et al., 2008; BERTUZZO et al., 2009). Neste contexto, capturas de rios admissivelmente são importantes processos biogeográficos (MAYDEN, 1988) e cladogenéticos (DURAND et al. 1999; ENGLBRECHT et al., 2000; KREISER et al., 2001). Táxons sedentários limitados a água doce em regiões ativas geologicamente provavelmente retêm a

assinatura genética da vicariância (WATERS et al., 2001, 2006). A hidrografia histórica sem dúvidas desempenha um papel chave na modelagem da estruturação genética de populações de peixes de água doce (HURWOOD; HUGHES, 1998; COSTELLO et al., 2003; KOTLÍK et al., 2004). Waters et al. (2006) sugeriram também que a combinação de dados genéticos e geológicos representam a chave para se determinar as histórias evolutivas da biota de peixes.

Dentre os peixes neotropicais, os membros da família Loricariidae, ou cascudos (do inglês - *armored catfishes*), representam um modelo apropriado para a investigação dos efeitos da evolução da paisagem na diversificação das linhagens. Estes peixes habitam a maioria dos ambientes aquáticos das regiões da América do Sul e Central. Um número superior a 900 espécies válidas são conhecidas até o momento para Loricariidae (ESCHMEYER; FONG, 2018), sendo um dos grupos mais especiosos dentro dos peixes neotropicais. Os loricariídeos demonstram uma ampla tolerância e distribuição geográfica. Diversas espécies habitam ambientes extremos ou são especialistas tróficos (LANGEANI, 1990; ARMBRUSTER, 1998; SABAJ et al., 1999; COVAIN et al., 2008), e diversas espécies são altamente endêmicas, com distribuição muito restrita (BIZERRIL, 1994; RIBEIRO, 2006).

As subfamílias Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Otothyriinae são reconhecidos com um clado natural (clado HNO) a partir das análises de dados morfológicos e moleculares (SCHAEFER, 1991; BIZERRIL, 1994; ARMBRUSTER, 2004; CRAMER et al., 2007, 2011; ROXO et al., 2014). O clado HNO contém aproximadamente 180 espécies, sendo que Neoplecostominae inclui 37 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2018). Os gêneros desta subfamília são *Kronichthys*, *Isbrueckerichthys*, *Pareiohaphis*, *Pareiohina*, *Neoplecostomus* e *Pseudocinclus* (ARMBRUSTER, 2004; CHIACHIO et al., 2008). *Isbrueckerichthys* foi primeiramente proposto por Derijst (1996) e incluía *Pareiohaphis duseni* e *Pareiohaphis alipionis*. Inicialmente, foram propostas apenas três espécies para o gênero sendo elas: *Isbrueckerichthys alipionis*, *Isbrueckerichthys duseni* e *Isbrueckerichthys epakmos*, sendo todas endêmicas da bacia do Rio Ribeira de Iguape (restritas às regiões costeiras do sul e sudeste brasileiro). Posteriormente, duas outras espécies foram descritas: *Isbrueckerichthys calvus* e *Isbrueckerichthys saxicola*, sendo ambas encontradas em subafluentes da Bacia do Rio Tibagi (Alto Paraná) sendo, portanto, atualmente desconectadas geograficamente de suas conspecíficas, ampliando a distribuição de

*Isbrueckerichthys* para o interior dos planaltos de altitude do escudo cristalino brasileiro (JEREP et al., 2006). Um estudo recente de sistemática integrativa demonstrou uma baixa distância genética e provável fluxo gênico entre *I. calvus* e *I. saxicola* na bacia do Rio Tibagi, onde os autores propuseram que *I. calvus* é sinônimo júnior de *I. saxicola* (ALMEIDA et al., capítulo 1).

Os representantes de Neoplecostominae, como *Isbrueckerichthys*, são restritos ao sul e sudeste brasileiro, tornando-os grupos chave para a investigação da hipótese de captura de cabeceira na biogeografia e filogeografia. Nesta região, Ribeiro (2006) propôs áreas onde ocorreram eventos históricos de captura de cabeceiras. Uma dessas áreas inclui as fronteiras da cabeceira do Rio Ribeira de Iguape (drenagem Atlântica, terras baixas) e também as fronteiras das bacias dos rios Tibagi e Iguaçu (drenagem do Paraná, terras altas). Nessa região a característica mais proeminente é o Arco de Ponta Grossa (Escarpa Devoniana). O Arco de Ponta Grossa consiste em um soerguimento do embasamento cristalino através do sudeste da bacia do Paraná, os quais incluem sistemas intrincados de falhas geológicas e fraturas. Reativações de falhas antigas podem levar a deslocamentos verticais entre blocos e promover as movimentações necessárias para a ocorrência de captura de cabeceiras e, conseqüentemente, eventos vicariantes e intercâmbio de fauna (RIBEIRO, 2006). Estes efeitos são comprovados pela ocorrência de espécies típicas de planícies costeiras Atlânticas nas porções mais elevadas do Alto Paraná (RIBEIRO, 2006, BARBOSA et al., 2017).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar os padrões de distribuição das espécies de *Isbrueckerichthys* adjacentes ao Arco de Ponta Grossa usando análises populacionais e biogeográficas, inferir uma filogenia calibrada e, discutir o papel geológico, evolutivo e biogeográfico dos eventos de captura de cabeceira na diversidade do gênero.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Coleta de amostras*

A captura dos exemplares de *Isbrueckerichthys* foi realizada através da extensão da distribuição das espécies entre os riachos do rio Ribeira de Iguape até riachos pertencentes à Bacia do rio Tibagi, passando pela borda da região do Arco de Ponta Grossa (Figura 1). As localidades de coleta, os números de indivíduos (n) e os números de acesso (*vouchers*) estão resumidos na Tabela I. Para testar a hipótese filogeográfica, os nomes das morfoespécies *I. duseni*, *I. saxicola* e *I. calvus* foram mantidos, embora um estudo de delimitação molecular de espécies demonstrar *I. calvus* como sinônimo júnior de *I. saxicola* (ALMEIDA et al., 2019, em preparação). Os peixes foram coletados sob licença do Ministério do Meio Ambiente e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO: 15117-1). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a regulamentação do Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo: 29/2016). Os espécimes foram fixados em formol 10% e estocados em álcool 70% para identificação e depósito na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá, (Maringá, Paraná, Brasil).

### *Extração de DNA PCR e sequenciamento*

O protocolo de extração de DNA foi realizado seguindo o protocolo com CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980) com adaptações ou, em alguns casos, usando *kit* de extração *Illustra Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit* – GE Healthcare, segundo as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram suspensas em água miliQ e estocadas a 4 °C.

Para a análise do fragmento mitocondrial foram amplificados fragmentos correspondentes à região Folmer (FOLMER et al., 1994; HEBERT et al., 2003) do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI ou COXI). A amplificação foi realizada utilizando

os *primers* FISH\_F1: 5'- TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' como *forward* e FISH\_R1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' como *reverse* (WARD et al., 2005). O programa de PCR consistiu em um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com 3 passos, sendo o primeiro passo a 94 °C por 30 segundos, o segundo passo a 54 °C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e o terceiro passo a 72 °C por 1 minuto, com um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando kit de purificação *GFX PCR DNA and Gel band purification Kit*, seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados utilizando 60 ng/μL de produto de PCR e 10 pmol de cada *primer* em sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilar de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

### ***Tratamento de sequências e alinhamento***

Cada sequência foi analisada separadamente quanto a qualidade do eletroferograma e, as sequências *forward* e *reverse* (complemento) foram alinhadas para obtenção de uma sequência consenso. Os consensos foram analisados quanto à similaridade e qualidade usando a ferramenta BLAST (BLATn) do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências foram checadas para a possível ocorrência de erros de alinhamento ou *stop codons* internos. Depois deste passo, todas as sequências foram alinhadas através do *software* ClustalW (LARKIN et al., 2007).

### ***Análises filogenéticas e moleculares***

O alinhamento foi submetido a um teste para identificação do melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos no JModeltest (DARRIBA et al., 2012), usando o critério de Informação de Akaike corrigido (BOZDOGAN, 1987). As análises filogenéticas de máxima verossimilhança foram realizadas utilizando o programa PhyML (GUINDON et al., 2010). Os valores de bootstrap foram utilizados para o suporte de ramo (FELSENSTEIN, 1985). A análise bayesiana foi obtida utilizando o *software* BEAST

(DRUMMOND et al., 2012). Em ambas as análises foram utilizadas sequências de COI de *Kronichthys heylandi*, *Otocinclus vittatus*, *Pareiohina carrancas*, e *Neoplecostomus microps* para o enraizamento e polarização da árvore. Sequências adicionais de *Isbrueckerichthys* foram obtidas nos bancos de dados e reunidas às demais sequências (Tabela V).

Para a análise bayesiana foram utilizadas 100.000.000 de gerações de Monte Carlo via Cadeias de Markov (Monte Carlo Markov Chains – MCMC). Os *softwares* acessórios Tracer e TreeAnnotator foram utilizados para analisar as estatísticas de estabilidade de cadeia e tamanho efetivo populacional (do inglês - *effective sample size* – ESS). Foram realizadas três diferentes análises bayesianas, utilizando três priors diferentes, *Yule*, *Coalescent* e *Birth-and-Death*. Os modelos de substituição e de nucleotídeos foram programados de acordo com os resultados do JModeltest. O modelo de relógio molecular utilizado foi o modelo “relógio relaxado não correlacionado” (do inglês - *uncorrelated relaxed clock*) (DRUMMOND et al., 2006). A taxa de *burn-in* estipulada foi de 10%.

Para as análises populacionais foram estimados os valores de diversidade haplotípica ( $h$ ), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e fluxo gênico no DNAsp (ROZAS et al., 2017). Valores de estatísticas  $\Phi_{ST}$  (HOLSINGER; WEIR, 2009) e Análises de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) foram obtidas no *software* Arlequin (EXCOFFIER; LISCHER, 2015).

Análises da estruturação bayesianas das sequências, assumindo uma estruturação baseada no modelo geológico foram realizadas utilizando no programa STRUCTURE (PRITCHARD, 2010). Uma rede haplotípica foi construída utilizando o critério de *median-joining* nos *softwares* NETWORK (<http://www.fluxus-engineering.com>) e PopArt (LEIGH AND BRYANT, 2015). A correlação entre a distribuição geográfica e a distância genética entre as sequências foi obtida no *software* *Alleles in Space* (MILLER, 2005).

Uma filogenia calibrada no tempo foi construída utilizando a inferência Bayesiana com o *prior* que apresentou melhor resultado no teste de comparação de modelos, usando o programa BEAST (DRUMMOND et al., 2012), com relógio no modelo “relaxado não correlacionado” (DRUMMOND et al., 2006). Foram utilizadas 100.000.000 de gerações de Monte Carlo via Cadeias de Markov. Uma árvore consenso foi obtida a cada 1000 gerações, e a topologia final representa um consenso de todas as árvores amostradas.



Para a calibração de tempo foram utilizadas as estimativas previamente estabelecidas para *Otocinclus vittatus* com idade aproximadamente de 49.9 milhões de anos, *Pareiohina carrancas* com aproximadamente 45.9 milhões de anos e *Kronickthys heylandi* com aproximadamente 13.0 milhões de anos, baseado nas análises prévias de Roxo et al. (2012; 2014).

## RESULTADOS

Foram analisadas 43 sequências de COI de *Isbrueckerichthys* mais quatro sequências de COI para *outgroups*. As 5 morfoespécies pertencentes ao gênero e, que se distribuem em diferentes localidades ao longo das bacias do rio Ribeira e Tibagi foram incluídas na análise. O alinhamento final das sequências de COI possui comprimento médio de 478 nucleotídeos, sendo que destes 233 foram variáveis e 132 foram informativos para parcimônia. O conteúdo GC encontrado foi de 48,7%. Os dados mostraram uma diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) = 0,859, e diversidade nucleotídica por sítio ( $h$ ) = 0,05026. Outras estatísticas moleculares estão resumidas na Tabela VI.

Análises filogenéticas de máxima verossimilhança e de inferência bayesiana mostram, em um panorama geral, o mesmo cenário, com dois clados maiores dividindo as populações de *Isbrueckerichthys* (Figuras 4 e 5). Um clado contém todas as sequências referentes à *I. duseni* (Figuras 4 e 5). O segundo clado reúne as morfoespécies *I. calvus* e *I. saxicola* dos ribeirões Charqueada, Taquara e Lindóia (Figuras 4 e 5).

As sequências de COI foram também utilizadas para a construção de rede de haplótipos (Figura 6). A rede de haplótipos mostrou pouco compartilhamento de haplótipos e nenhuma sobreposição de haplótipo entre as espécies (Figura 6). A exceção está para as morfoespécies *I. saxicola* e *I. calvus* (sugerem um único táxon), as quais compartilham o haplótipo 3.

Foram encontrados no total 21 haplótipos ( $h=0,86$ ), sendo que o haplótipo 3 é compartilhado por 12 sequências de *I. saxicola* e quatro de *I. calvus*, indicando fluxo gênico entre as morfoespécies. O haplótipo 3 possui conexões com os haplótipos referentes às demais espécies e populações e, difere de haplótipos de *I. duseni* por apenas um passo mutacional (por exemplo, haplótipos 4, 5), indicando proximidade entre *I. duseni* e *I. saxicola+I. calvus* (Figura 6).

A filogenia calibrada no tempo através do *prior birth-and-death* mostra que, provavelmente, o ancestral de *I. duseni* atingiu as regiões mais altas do escudo cristalino diversificando em *I. saxicola* (mais *I. calvus*) entre 5-12 milhões de anos atrás (Figura 7).

Os gráficos de estruturação populacional usando  $K=2$  (*I. duseni* [1]/*I. saxicola+I. calvus* [2]) (modelo ancestral com modelo de não mistura e frequências não

correlacionada) baseada em resultados das filogenias e das redes haplotípicas demonstraram alguma mistura entre as duas localidades e gradiente entre *I. duseni* para *I. saxicola*+*I. calvus* (Figura 8a). Além disso, a Variância Molecular através do índice de fixação de  $\Phi_{ST}$  foi testado de acordo com os diferentes arranjos de estruturação mais prováveis. A estruturação considerando *I. duseni* como uma população e *I. calvus* e *I. saxicola* como outra mostrou  $\Phi_{ST} = 0.46$  ( $p < 0,5$ ), que é considerado um valor alto e confiável para estruturação populacional (Tabela VII) A análise considerando cada população com individual mostrou  $\Phi_{ST} = 0.37$ . Análises de correlação espacial de Teste de Mantel mostraram uma forte correlação positiva ( $r = 0.6234$ ,  $p=0.00099$ ) entre a diversidade genética e a distância espacial entre as populações amostradas (Figura 9).

## DISCUSSÃO

Espécies de Neoplecostominae são distribuídas em regiões elevadas do sul e sudeste brasileiro e são conhecidamente habitantes de água com alta concentração de oxigênio (LANGEANI, 1990). Provavelmente suas espécies tem dificuldades na adaptação em rios com elevações mais baixas devido à baixa concentração de oxigênio na água comparados com rios de regiões mais elevadas (LANGEANI, 1990). As árvores filogenéticas mostram uma restrita relação entre as espécies e um provável cenário onde a dispersão de *Isbrueckerichthys* ocorrendo nas delimitações entre o Primeiro (regiões das bacias costeiras do Rio Ribeira de Iguape) e o Segundo (terras elevadas da bacia do Tibagi – Alto Paraná) Planaltos Paranaenses de acordo com mecanismos de captura de cabeceiras propostos para a área geológica em questão (RIBEIRO, 2006).

A principal característica geológica nos limites entre o Primeiro e Segundo Planaltos Paranaenses englobando as bacias dos rios Tibagi, Iguazu e Ribeira de Iguape é o Arco de Ponta Grossa (Escarpa Devoniana) (RIBEIRO, 2006). Na literatura é notório que o Arco de Ponta Grossa tem uma tendência ao soerguimento e sua atividade tectônica pode ter acelerado o dinamismo fluvial entre bacias adjacentes e promoveu o intercâmbio faunístico (RAPOSO, 1995; ALMEIDA; CARNEIRO, 1998; RIBEIRO, 2006, BARBOSA et al., 2017). Nossos dados sugerem que populações *I. duseni* das cabeceiras próximas da borda leste do Arco de Ponta Grossa são um grupo monofilético no rio Ribeira de Iguape. As morfoespécies *I. calvus* e *I. saxicola* foram amostradas na porção oeste do Arco de Ponta Grossa, em diferentes tributários da bacia do rio Tibagi. Um estudo de identificação molecular prévio demonstrou que estas morfoespécies compõem um único táxon molecular e a sinonímia de *I. calvus* foi proposta para *I. saxicola* (ALMEIDA et al., 2019, em preparação).

Ribeiro (2006) propôs uma série de padrões (nomeados A, B e C) para explicar a distribuição da ictiofauna a partir de eventos geológicos. O estudo descreveu ainda as relações de grupos irmãos observados entre linhagens que habitam as regiões costeiras e as que habitam o interior da Bacia do Paraná (RIBEIRO, 2006). O “Padrão A” representa os eventos mais antigos, o “Padrão B” representa eventos históricos intermediários, com relações entre as regiões costeiras e a terras elevadas adjacentes com grau intermediário de inclusividade, e o “Padrão C” com os eventos vicariantes mais recentes de intercâmbio,

o que leva a pontos onde há um compartilhamento de espécies ou “zonas híbridas”. O padrão filogeográfico sugerido para espécies de Neoplecostominae e Otothyrinae é o “Padrão B” Roxo et al. (2014) e nossos dados mostram que para *Isbrueckerichthys* o “Padrão C” é o que mais se ajusta aos dados, com *I. duseni* atingindo recentemente as porções mais elevadas e divergindo em *I. calvus* e *I. saxicola*. As baixas distâncias genéticas (Tabela III) entre *I. duseni* e *I. saxicola* + *I. calvus* ( $2,1\% \pm 0,38\%$  e  $1,64 \pm 0,38\%$  respectivamente), as relações estritamente próximas nas análises de inferência bayesiana e máxima verossimilhança (Figuras 4 e 5), rede haplotípica (Figura 6) e de estruturação bayesiana do STRUCTURE (Figura 8a) não são suficientemente próximas para sugerir que sejam a mesma espécie. Entretanto, este conjunto de dados demonstrou resultados próximos e consistentes para propor que *I. duseni* e *I. saxicola* + *I. calvus* divergiram de um mesmo ancestral comum por evento de captura de cabeceira há aproximadamente 8 (5-12) m.a. conforme Figura 7, e que a espécie diferenciou a partir de então em tributários de “terras altas” da bacia do rio Tibagi. Para o estágio evolutivo atual os nossos dados demonstram que a espécie molecular *I. saxicola* ocupa os tributários do rio Tibagi e, esta área pode representar uma “zona híbrida” de transição das morfoespécies *I. saxicola* e *I. calvus*, como sugerido para o “Padrão C” de relações filogenética proposto por Ribeiro (2006).

Movimentos verticais, reativação de falhas antigas e processos erosivos dos rios promovem a mistura entre bacias adjacentes e mais provavelmente podem explicar o intercâmbio faunístico entre as linhagens mais ancestrais movendo das regiões costeiras para as terras altas (RIBEIRO, 2006). Nossas análises sugerem que uma linhagem de *Isbrueckerichthys* que habitava a região leste do Arco de Ponta Grossa atingiu a porção mais alta do escudo cristalino através de eventos de captura de cabeceira e desde então tem se diversificado. Este cenário é congruente com os eventos históricos de captura de cabeceiras propostos para a região do Arco de Ponta Grossa (RIBEIRO, 2006; VICARI et al., 2006; CHIACHIO et al., 2008; ROXO et al., 2012, 2014). Os padrões de inclusividade demonstrados na análise STRUCTURE (Figura 8a) também suportam estes dados.

Outros estudos encontraram resultados semelhantes e congruentes com o padrão C de dispersão como, por exemplo, Silva (2004) que descreve a distribuição de *Bryconamericus patriciae* que ocorre tanto no Alto Uruguai quando nas regiões costeiras do rio Jacuí. Reis et al. (1990) mostram o mesmo padrão ao descrever *Hypostomus*

*commersonni* e *H. aspilogaster* ocorrendo no rio Uruguai e também no rio Jacuí e em outros tributários costeiros do sistema da Lagoa dos Patos. Alguns grupos como *Trichomycterus davisi* (INGENITO et al., 2004), *Hypostomus ancistroides* (OYAKAWA et al., 2005), *Rhamdiopsis moreirai* (BIZERRIL; LIMA, 2000) mostram compartilhamento de espécies entre o Alto Iguazu e a bacia do Ribeira de Iguape.

Análises de Roxo et al. (2012) também sugerem que o ancestral de *Isbrueckerichthys* habitava as bacias costeiras e eventos de captura de cabeceira levaram o gênero a distribuir-se no interior cerca há de 4.8 (2.3 – 7.8), 5.9 (2.9-9.5) e 10.6 (.5.5-16.5) milhões de anos atrás. Nossos resultados mostram uma dispersão congruente com a dispersão de *Isbrueckerichthys* entre 8 (5-12) milhões de anos (Figura 7), como proposto por Roxo et al. (2012). Embora seja importante ressaltar que esta análise é baseada em dados *single locus*, apenas com DNA mitocondrial, que notadamente possui uma maior taxa de mutação (BROWN et al., 1979).

A análise de *bayesian skyline plot* que analisa a flutuação demográfica populacional das linhagens durante o tempo (Figura 8b) mostra que houve uma certa estabilidade nos números de tamanho efetivo populacional durante os primeiros estágios da história evolutiva do grupo, que então passou a subir exponencialmente entre 10 e 5 milhões de anos, que coincide com a diversificação de *I. duseni* para *I. saxicola* (e a sinônima *I. calvus*) no interior do escudo cristalino. Estes dados indicam que o evento de captura de cabeceira promoveu a geodispersão das espécies que atingiram novos nichos e passaram a diversificar e, a aumentaram exponencialmente seus efetivos populacionais.

Em outra análise, o Teste de Mantel (Figura 9) mostra uma forte correlação entre a distância genética e a distribuição espacial para as populações de *Isbrueckerichthys*. Este resultado confirma a hipótese de que eventos de capturas de rios contribuíram para a dispersão e diferenciação de espécies de *Isbrueckerichthys* nas regiões da bacia do Rio Tibagi.

Os resultados demonstraram que *I. duseni* amostrado na população capturada no ribeirão da Areia, o qual está localizado na margem leste do Arco de Ponta Grossa (“terras baixas” da bacia do Ribeira de Iguape) tem forte correlação com a população da espécie molecular *I. saxicola* mais próxima, localizada no ribeirão Charqueado (“terras altas” da bacia do rio Tibagi) e, a partir desta, com as outras populações amostradas nos ribeirões Taquara e Lindóia. Neste caso, este evento promoveu a geodispersão e diferenciação de

*Isbrueckerichthys* nos diferentes tributários da bacia do Rio Tibagi. Em última análise, com o conjunto de dados avaliados e a inconsistência entre os dados da identificação morfológica (JEREP et al., 2006) e os dados de delimitação molecular de espécies (de ALMEIDA et al., capítulo 1) é possível inferir um processo de especiação incipiente entre *I. calvus* e *I. saxicola* na bacia do rio Tibagi. Neste caso, a taxa de evolução morfológica em novos nichos para as populações do rio Tibagi demonstrou ser mais rápida do que a evolução molecular, a qual demanda tempo para diferenciação e isolamento do compartilhamento de haplótipos.

*Isbrueckerichthys epakmos* se mostrou parafilético nestas análises, tanto nos agrupamentos de *neighbor-joining*, quanto de máxima verossimilhança e inferência bayesiana, agrupando-se ora dentro do ramo referente à *I. duseni* ora no grupo referente a *I. calvus*+*I. saxicola*. Isto pode ser devido à baixa amostragem dessa espécie (apenas 3 sequências), ou à erros na classificação dos espécimes depositados nos bancos de dados. Da mesma forma, *I. alipionis* não forma grupos monofiléticos nas análises filogenéticas, mas com poucos passos filogenéticos adicionais para a monofilia, o que também se deve ao fato da baixa amostragem. Porém, estas sequências foram incluídas para uma investigação mais ampla, e não são o foco do estudo, que tinha objetivo investigar os padrões mais específicos em relação aos planaltos paranaenses entre *I. duseni*, *I. saxicola* e *I. calvus*, sendo necessários estudos com melhores amostragens destes táxons para um panorama mais global.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados corroboram com a proposta do Padrão C de distribuição da biodiversidade proposto por Ribeiro (2006) para a explicação da atual distribuição dos táxons de *Isbrueckerichthys* na bacia do rio Tibagi a partir de linhagens existentes na bacia do rio Ribeira. Este evento pretérito promoveu a inclusão da fauna de rios das regiões costeiras para as bacias adjacentes do escudo cristalino brasileiro (RIBEIRO, 2006; ROXO et al., 2012, 2014). Nossos dados de datações pela filogenia calibrada com relógio molecular coincidem com eventos de captura de cabeceira que ocorreram na mesma época há ~8 m.a. e que a geodispersão de *I. duseni* o interior da Bacia do Alto Paraná (tributários do rio Tibagi) deu origem a linhagens para a diferenciação das espécies

morfológicas (*I. saxicola* e *I. calvus*). As análises de delimitação molecular *single locus* de espécies demonstram que *I. saxicola* e *I. calvus* pertencem à mesma categoria taxonômica. As estreitas relações entre *I. duseni* e *I. saxicola+I. calvus*, os resultados das redes haplotípicas e dos gráficos de atribuição bayesiana também corroboram com a proposta de fluxo gênico entre *I. saxicola+I. calvus*. O compartilhamento do *background* genético para este marcador entre estas duas morfoespécies pode representar uma especiação incipiente, e representar a ocorrência de uma “zona híbrida” nas “terras altas” da região do Arco de Ponta Grossa. Este fato é congruente com as características descritas para o padrão C da distribuição da biodiversidade que diversificou recentemente.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Ministério do Meio Ambiente / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA / ICMBio No. 15117) pelas autorizações de coleta de exemplares. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Fundação Araucária) pelo suporte financeiro durante o estudo. Ao Professor Dr. Cláudio Oliveira da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Campus Botucatu pelo empréstimo de tecidos de indivíduos utilizados neste estudo.



## **REFERÊNCIAS**

As referências bibliográficas encontram-se no final da tese, na seção 5.

**Tabela V.** Lista dos exemplares amostrados, suas identificações, números de acesso.

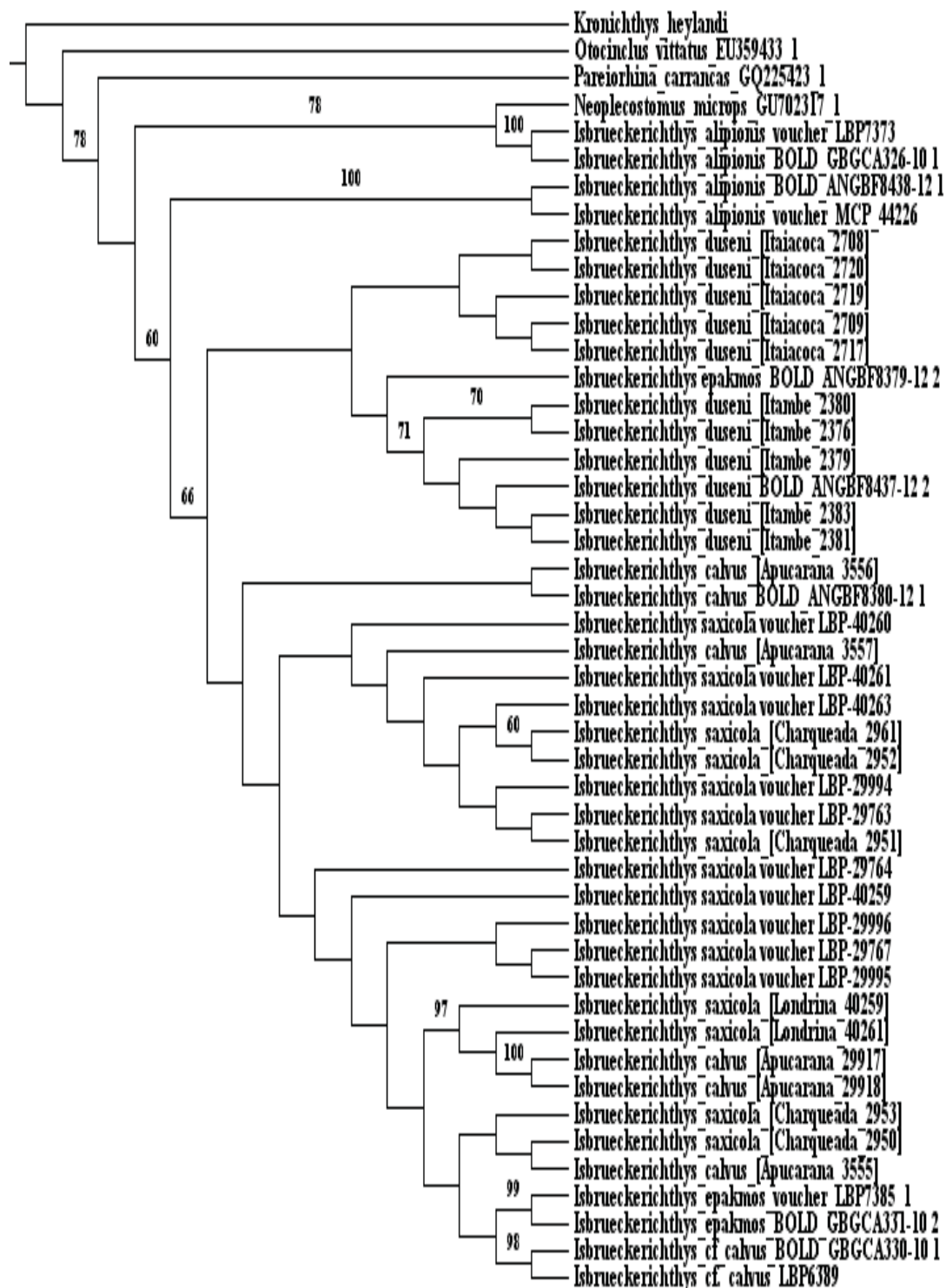
#	Espécies	Número de acesso (voucher)	Origem
1	<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>	BOLD ANGF8438-12 2	BOLD systems
2		BOLD MCP 44226	BOLD systems
3		BOLD GBGCA326-10 2	BOLD systems
4		BOLD LBP7373	BOLD systems
5	<i>Isbrueckerichthys epakmos</i>	BOLD ANGBF8379-12 2	BOLD systems
6		BOLD GBGCA331-10 2	BOLD systems
7		BOLD LB7385 1	BOLD systems
8	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Itambé 2376	Este estudo
9		Itambé 2379	Este estudo
10		Itambé 2380	Este estudo
11		Itambé 2381	Este estudo
12		Itambé 2383	Este estudo
13		Itaiacoca 2708	Este estudo
14		Itaiacoca 2709	Este estudo
15		Itaiacoca 2717	Este estudo
16		Itaiacoca 2719	Este estudo
17		Itaiacoca 2720	Este estudo
18		BOLD ANGBF8437-12 2	BOLD systems
19	<i>Isbrueckerichthys saxicola</i>	Londrina 40261	Este estudo
20		Londrina 40259	Este estudo
21		BOLD LBP-29763	BOLD systems
22		BOLD LBP-29995	BOLD systems
23		BOLD LBP-29996	BOLD systems
24		BOLD LBP-29764	BOLD systems
25		BOLD LBP-40263	BOLD systems
26		BOLD LBP-40260	BOLD systems
27		BOLD LBP-29994	BOLD systems
28		BOLD LBP-40261	BOLD systems
29		BOLD LBP-40259	BOLD systems
30		BOLD LBP-29767	BOLD systems
31		Charqueada 2950	Este estudo
32		Charqueada 2951	Este estudo
33		Charqueada 2952	Este estudo
34		Charqueada 2953	Este estudo
35		Charqueada 2961	Este estudo
36	<i>Isbrueckerichthys calvus</i>	Apucarana 3555	Este estudo
37		Apucarana 3556	Este estudo
38		Apucarana 3557	Este estudo
39		Apucarana 29917	Este estudo
40		Apucarana 29918	Este estudo
41		BOLD ANFGBF8380-12 1	BOLD systems
42		BOLD GBGCA330-10 1	BOLD systems
43		BOLD LBP6389	BOLD systems

**Tabela VI.** Estatísticas moleculares e melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos para as sequências de COI de *Isbrueckerichthys*

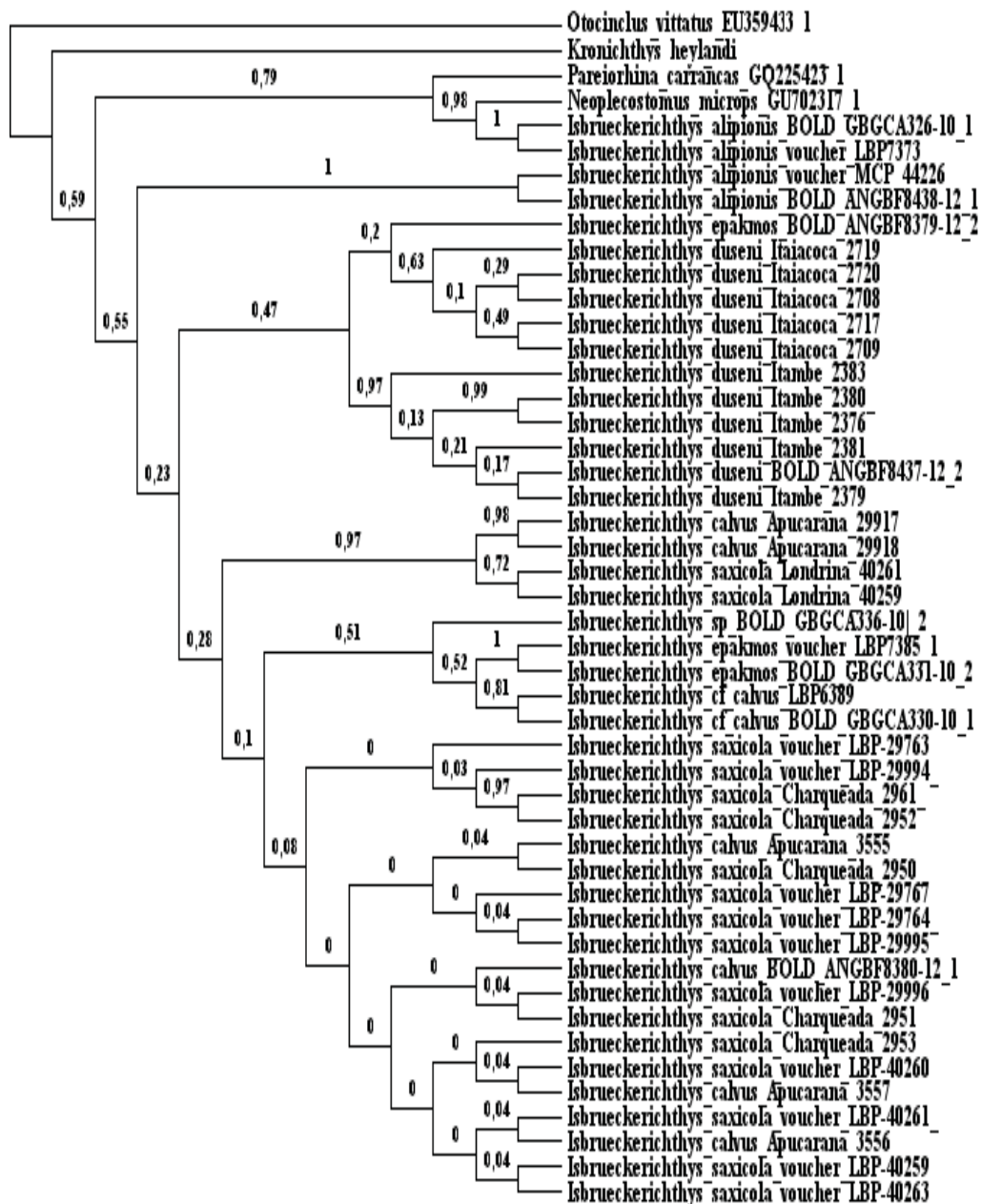
Modelo selecionado	AICc	-lnL	K	freqA	freqC	freqG	freqT	ti/tv	p-inv	G	Conteúdo GC	Diversidade haplotípica (h)	Diversidade nucleotídica por sítio ( $\pi$ )
K2+G	6100,4494	-2958,8714	41	0,25	0,25	0,25	0,25	11.358	0.1300	-	0,487	0,859	0,05026

**Tabela VII.** Índices de fixação  $\Phi_{ST}$  baseados na estruturação considerando (*I. duseni*; *I. saxicola* + *I. calvus*).

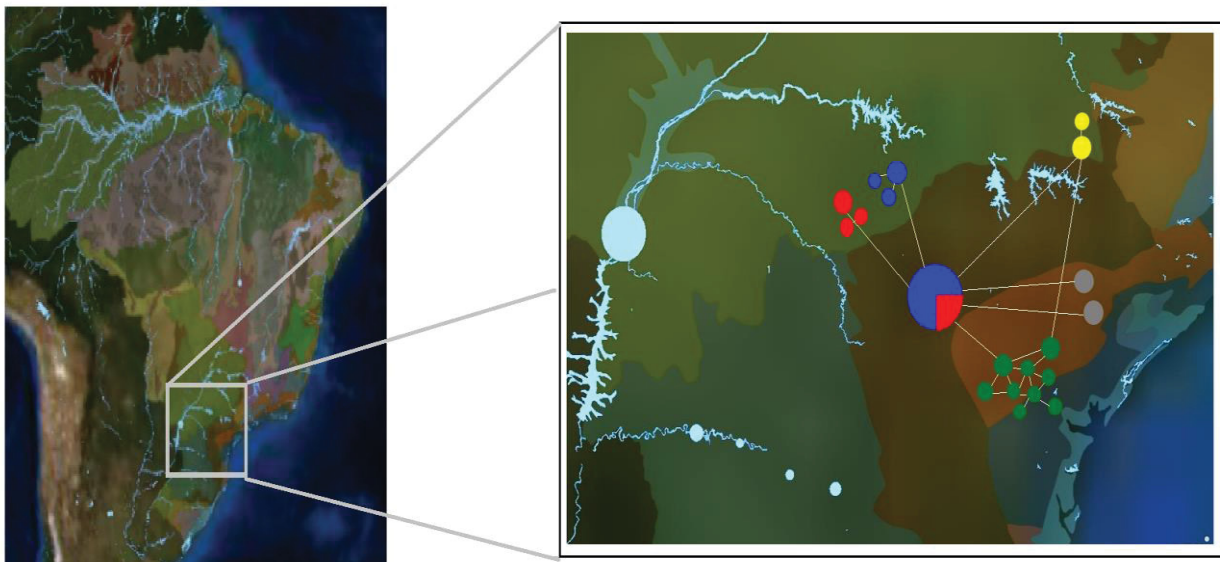
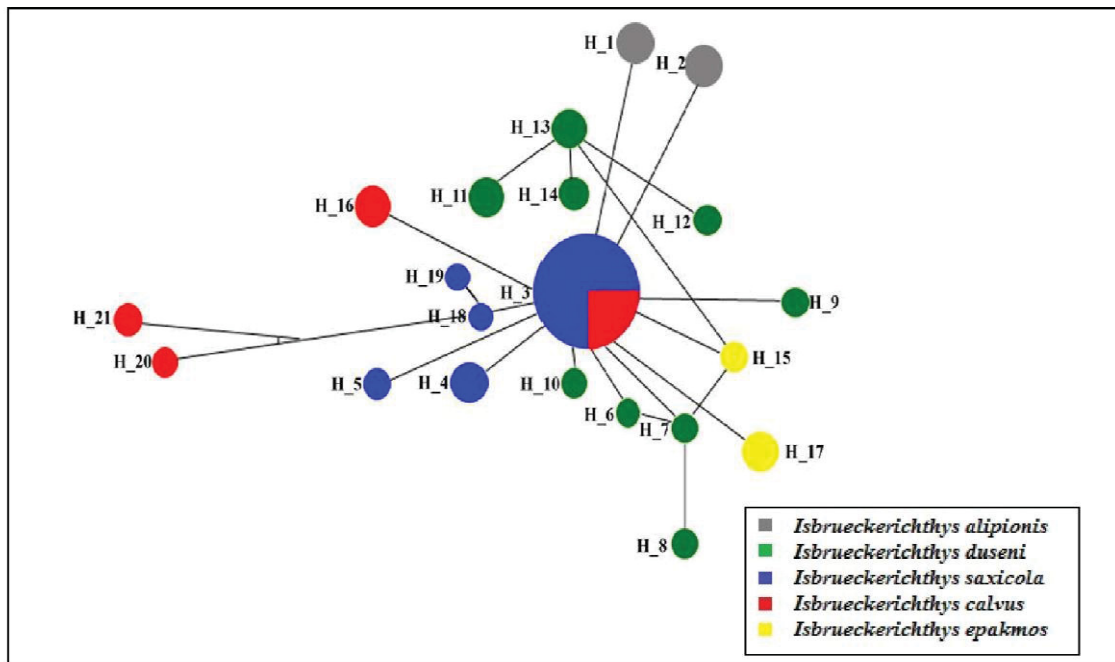
<b>Origem da variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Componentes da variância</b>	<b>Porcentagem de variação</b>
<b>Entre grupos</b>	450.314	24.76993	40.95641
<b>Entre populações dentro dos grupos</b>	68.339	3.30269	5.46091
<b>Entre populações</b>	1069.402	32.40613	53.58268
<b>Total</b>	1588.056	60.47875	
$\varphi_{SC}$	0.09249		
$\varphi_{ST}$	<b>0.46417</b>		
$\varphi_{CT}$	0.40956		



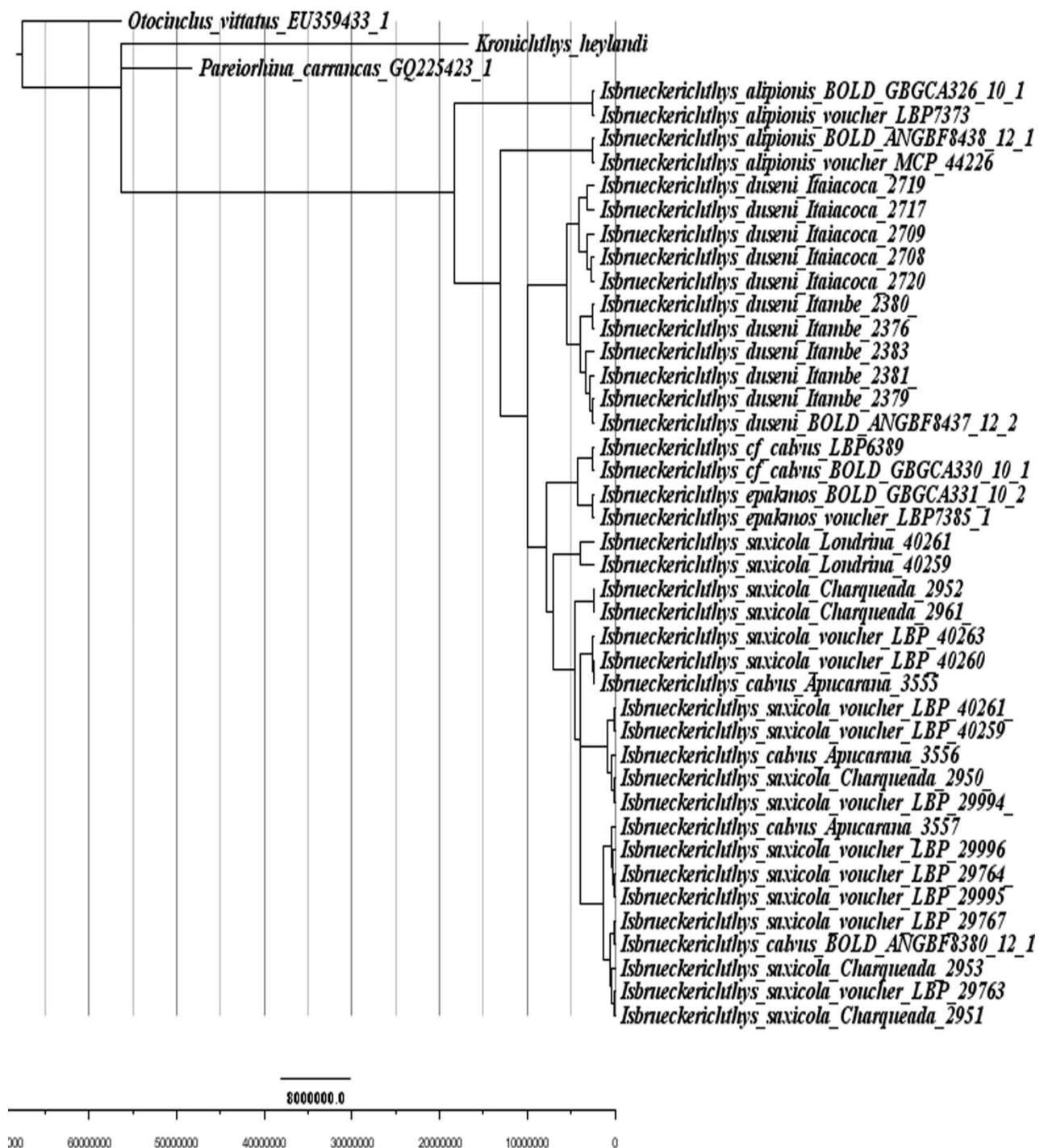
**Figura 4.** Árvore de máxima verossimilhança inferida no PhyML, programado com o modelo de substituição de nucleotídeos K2P+G. Números acima dos ramos indicam os valores de confiabilidade do teste de *bootstrap* com 1000 replicações.



**Figura 5.** Árvore filogenética inferida através de análise bayesiana no BEAST, com 100.000.000 de gerações de Monte Carlo via Cadeias de Markov, com relógio relaxado não correlacionado, distribuição lognormal, *birth and death*, 8 categorias gama, programada com o modelo de substituição K2P+G. Números acima dos ramos representam os valores de probabilidade posterior.

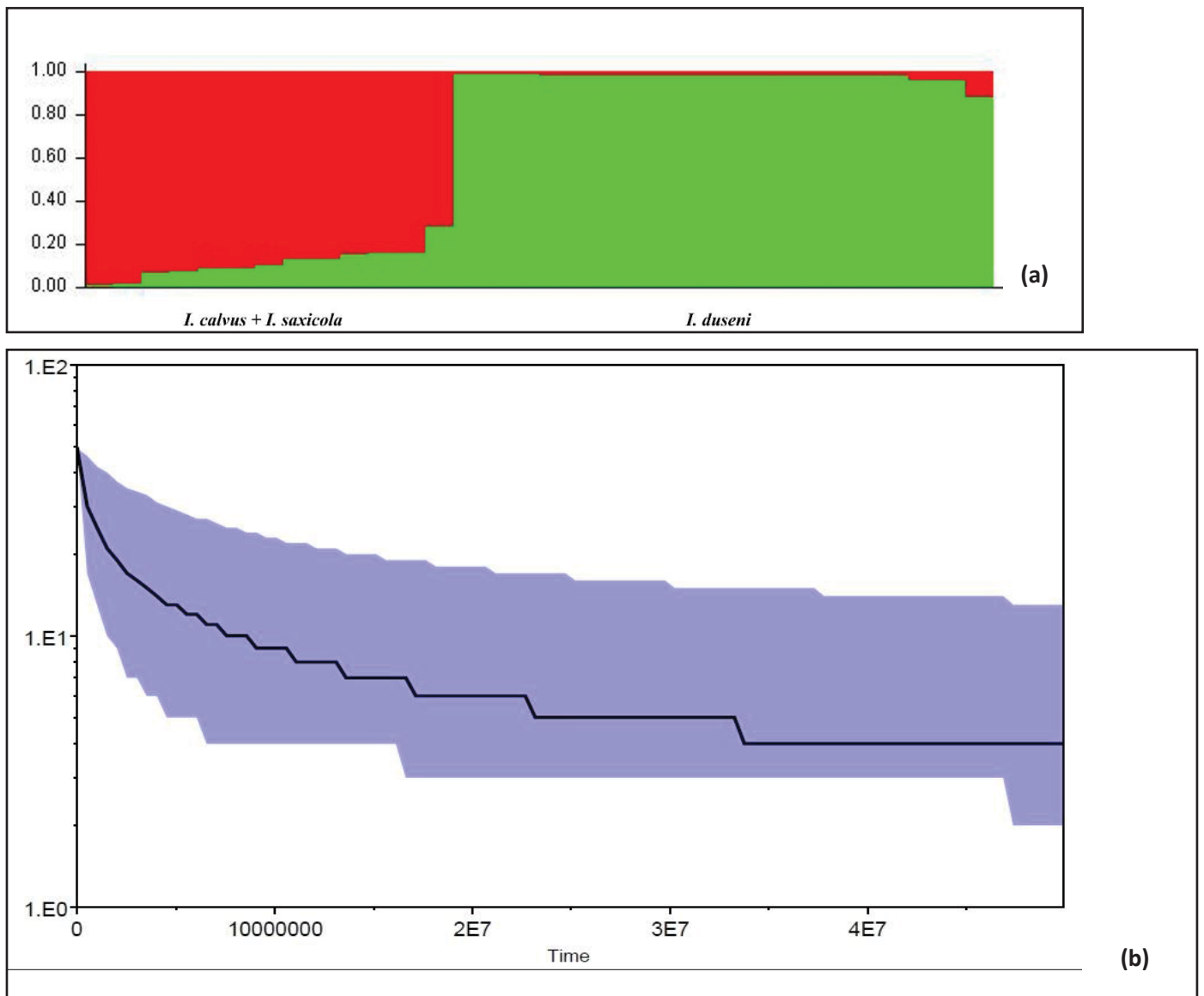


**Figura 6.** No topo Rede haplotípica construída através do algoritmo de *median-joining* usando sequências de COI de *Isbrueckerichthys* (no topo). Círculos representando os haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo, e as cores referem-se a espécies/populações diferentes. Abaixo, distribuição dos haplótipos nos locais de coletas.

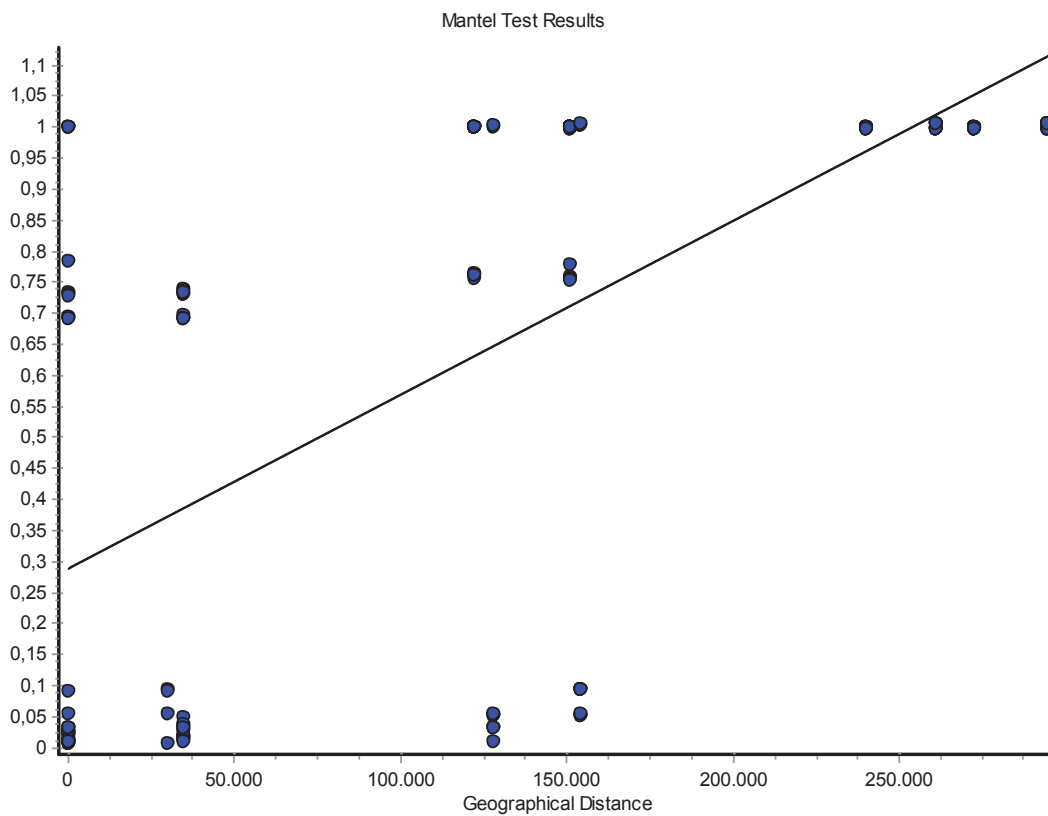


**Figura 7.** Filogenia calibrada no tempo geológico para COI, realizada no BEAST. Usando 3 tempos diferentes de calibração. O relógio molecular considerado foi o modelo relaxado não correlacionado, usando o *prior* de *Birth and Death*. A escala está representada em milhões de anos.





**Figura 8.** (a) Gráfico de estruturação populacional do STRUCTURE, usando o “modelo sem mistura” com  $K=2$  (*I. duseni*/*I. saxicola*+*I. calvus*); (b) gráfico da análise de *bayesian skyline plot* das linhas através do tempo (eixo x).



**Figura 9.** Teste de Mantel apresentando as distâncias genéticas contra as distâncias geográficas dos indivíduos amostrados (correlação positiva com  $r^2=0.6234$ , com  $p<0.00099$ )

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados moleculares obtidos neste estudo aumentam significativamente o número de sequências disponíveis para *Isbrueckerichthys* que antes eram escassos e com amostragem esparsa.

As análises de delimitação de espécies e de identificação molecular de espécies demonstram que a variabilidade genética não acompanhou a taxa de evolução morfológica. Os caracteres morfológicos são a base das chaves de identificação de *Isbrueckerichthys*. No entanto, o estudo de delimitação molecular de espécies mostrou que ao menos duas categorias taxonômicas dentro do grupo, *Isbrueckerichthys saxicola* e *Isbrueckerichthys calvus* correspondem a um único táxon. Este tipo de análise de resolução de incertezas taxonômicas é de fundamental importância para aplicações posteriores de evolução e filogenia do grupo. As diferenças entre os caracteres morfológicos utilizados para a classificação taxonômica de *Isbrueckerichthys* são sutis e, de difícil detecção/aplicação por taxonomistas não especialistas no grupo. Os marcadores cromossômicos também não são capazes de uma distinção clara entre as espécies de *Isbrueckerichthys*. Em última análise, a identificação e delimitação de espécies utilizando dados moleculares podem ser fundamentais para a diagnose correta de espécies de *Isbrueckerichthys*.

Com relação à hipótese de diversificação e evolução do grupo através de eventos de captura de rios a presente análise é concordante com os padrões já anteriormente apresentados para espécies de Neoplecostominae. Nossos dados demonstraram que eventos de captura de cabeceiras de rios tiveram contribuição marcante na atual distribuição, diversificação e evolução dos táxons de *Isbrueckerichthys*. Neste gênero de peixes, especificamente, o Padrão C de evolução proposto por Ribeiro (2006) é congruente com a dispersão de *Isbrueckerichthys duseni* das bacias costeiras atingindo as terras mais altas do escudo cristalino entre 5-12 milhões de anos, diversificando nas espécies de *Isbrueckerichthys* do interior, ou seja *I. saxicola* (+*I. calvus*).

## 6. REFERÊNCIAS

- ABELL, R.; THIEME, M.L.; REVENGA, C. ET AL.; Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. **BioScience**, 58, 403–414. 2008
- ALBERT, J.S.; CRAMPTON, W.G. The geography and ecology of diversification in Neotropical freshwaters. **Nat. Educ. Knowl.** 1(10): 13. 2010.
- ALBERT, J.S.; PETRY, P.; REIS, R.E. Major biogeographic and phylogenetic patterns. **Hist. Biogeogr. Neotrop.** Freshw. fishes: 21–57. University of California Press Berkeley. 2011.
- ALMEIDA, F.F.M.; HASUI, Y.; BRITO NEVES, B.B.; FUCK, R.A. Brazilian structural provinces: an introduction. **Earth-Science Reviews**, 17(1–2): 1–29. 1981.
- ALMEIDA, F.; CARNEIRO, C. Origem e evolução da Serra do Mar. **Rev. Bras. Geociências** 28(2): 135–150. Available from [http://www.sbgeo.org.br/pub\\_sbg/rbg/vol28\\_down/2802/2802135.pdf](http://www.sbgeo.org.br/pub_sbg/rbg/vol28_down/2802/2802135.pdf). 1998.
- ALMEIDA, F.F.M.; BRITO NEVES, B.B.; CARNEIRO, C.D.R. The origin and evolution of the South American Platform. **Earth-Science Reviews** 50, 77–111. 2000.
- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica** 124(2): 127–136. doi:10.1007/s10709-004-7561-4. 2005.
- ANDREATA, A.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; DE OLIVEIRA, C.; FILHO, S.D.A.T. Chromosome Studies in Hypoptopomatinae ( Pisces , Siluriformes , Loricariidae ): I . XX / XY Sex Chromosome Heteromorphism in Pseudotocinclus tietensis. **Cytologia (Tokyo)**. 57: 369–372. doi:10.1508/cytologia.57.369. 1992.
- APRIL, J.; HANNER, R.H.; DION-CÔTÉ, A.M.; BERNATCHEZ, L. Glacial cycles as an allopatric speciation pump in north-eastern American freshwater fishes. **Mol. Ecol.** 22(2): 409–422. doi:10.1111/mec.12116. 2013.
- ARMBRUSTER, J.W. Modifications of the Digestive Tract for Holding Air in Loricariid and Scoloplacid Catfishes Author ( s ): Jonathan W . Armbruster Published by : American Society of Ichthyologists and Herpetologists ( ASIH ) Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/14477>. 3(3): 663–675. 1998.
- ARMBRUSTER, J.W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfish

- (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and Ancistrinae. **Zool. J. Linn. Soc.** **141**(March): 1–80. 2004.
- ATKINSON, Q.D.; GRAY, R.D.; DRUMMOND, A.J. mtDNA variation predicts population size in humans and reveals a major Southern Asian chapter in human prehistory. **Molecular Biology and Evolution**, **25**, 468–474. 2008.
- AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **J. Biogeog.** **36**:3–15. 2009.
- BARBOSA, P.; PUCCI, M.B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R. Karyotype analysis of three species of Corydoras (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. **Neotrop. Ichthyol.** **15**(1): 1–8. doi:10.1590/1982-0224-20160056. 2017.
- BARRACLOUGH, T.G.; HUGHES, M.; ASHFORD-HODGES, N.; FUJISAWA, T. Inferring evolutionarily significant units of bacterial diversity from broad environmental surveys of single-locus data. **Biol. Lett.** **5**(3): 425–428. doi:10.1098/rsbl.2009.0091. 2009.
- BELLAFRONTE, E.; MARIGUELA, T.C.; PEREIRA, L.H.G.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, O. Dna barcode of parodontidae species from the La Plata river basin -applying new data to clarify taxonomic problems. **Neotrop. Ichthyol.** **11**(3): 497–506. doi:10.1590/S1679-62252013000300003. 2013.
- BERTOLLO, L.A.C. Cytotaxonomic considerations on Hoplias lacerdae (Pisces, Erythrinidae). **Rev. Bras. Genet.** **1**: 103–120. 1978.
- BERTUZZO, E.; MUNEEPEERAKUL, R.; LYNCH, H.J.; FAGAN, W.F.; RODRIGUEZ-ITURBE, I.; RINALDO, A. On the geographic range of freshwater fish in river basins. **Water Resour. Res.** **45**(11): 1–11. doi:10.1029/2009WR007997. 2009.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends Ecol. Evol.** **22**(3): 148–155. doi:10.1016/j.tree.2006.11.004.
- BISHOP, P. 1995. Drainage rearrangement by river capture, beheading and diversion. **Prog. Phys. Geogr.** **19**(4): 449–473. doi:10.1177/030913339501900402. 2007.
- BIZERRIL, C.R.S.F. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. **Acta Biológica Leopoldensia** **16**(1): 51–80. 1994.
- BIZERRIL, C.R.S.F.; LIMA, N.R.W. Levantamento da ictiofauna da bacia do rio Ribeira de Iguape, Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, **22**(1): 103–110. 2000.
- BOZDOGAN, H. Model selection and Akaike's Information Criterion (AIC): The

- general theory and its analytical extensions. **Psychometrika** **52**(3): 345–370. doi:10.1007/BF02294361. 1987.
- BROWN, W.M.; GEORGE, M.; WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **76**(4): 1967–1971. doi:10.1146/annurev.es.18.110187.001413. 1979.
- BROWN, W.M.; PRAGER, E.M.; WANG, A.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. **J. Mol. Evol.** **18**, 225–239. 1982.
- CAMPOS P.F.; WILLERSLEV, E.; SHER, A. et al. Ancient DNA analyses exclude humans as the driving force behind late Pleistocene musk ox (*Ovibos moschatus*) population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **107**, 5675–5680. 2010.
- CENTOFANTE, L.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; BUCKUP, P.A.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosome analyses in species of Pareiorhina (Siluriformes, Loricariidae) and cytotaxonomic considerations on the group. **Nucl.** **54**(2): 65–70. doi:10.1007/s13237-011-0035-z. 2011.
- CHEROBIM, A.M.; LAZZAROTTO, H.; LANGEANI, F. A new species of the catfish *Neoplecostomus* (Loricariidae: Neoplecostominae) from a coastal drainage in southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology** **14**(December): 1–12. doi:10.1590/1982-0224-20160015. 2016.
- CHIACHIO, M.C.; OLIVEIRA, C.; MONTOYA-BURGOS, J.I. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Mol. Phylogenet. Evol.** **49**(2): 606–617. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.ympev.2008.08.013. 2008.
- COBBOLD, P.R.; MEISLING K.E.; MOUNT, V.S. Reactivation of an obliquely rifted margin, Campos and Santos basins, southeastern Brazil. **The American Association of Petroleum Geologists Bulletin**, **85**(11): 1925–1944. 2001.
- CORDANI, U. G.; SATO, K.; TEIXEIRA, W.; TASSINARI, C.C.G.; BASEI, M.A.S. Crustal evolution of the South American Platform. Pp. 19–40. In: Cordani, U. G., E. J. Milani, A. Thomaz-Filho & D. A. Campos (Eds). Tectonic evolution of South America. 31st International Geological Congress. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, e Departamento Nacional da Produção Mineral (DNPM), 856p. 2000.

- COSTA, W.J.E.M. The Neotropical annual fish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, 12(4): 333–383. 2001.
- COSTELLO, A.B.; DOWN, T.E.; POLLARD, S.M.; PACAS, C.J.; TAYLOR, E.B. The influence of history and contemporary stream hydrology on the evolution of genetic diversity within species: an examination of microsatellite DNA variation in bull trout, *salvelinus confluentus* (pisces: salmonidae). **Evolution (N. Y.)**. 57(2): 328–344. doi:10.1554/0014-3820(2003)057[0328:TIOHAC]2.0.CO;2. 2003.
- COVAIN, R.; DRAY, S.; FISCH-MULLER, S.; MONTOYA-BURGOS, J.I. Assessing phylogenetic dependence of morphological traits using co-inertia prior to investigate character evolution in Loricariinae catfishes. **Mol. Phylogenet. Evol.** 46(3): 986–1002. doi:10.1016/j.ympev.2007.12.015. 2008.
- COX, K.G. The role of mantle plumes in the development of continental drainage patterns. **Nature**, 342: 873–876. 1989.
- CRAMER, C.A.; BONATTO, S.L.; REIS, R.E. Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. **Mol. Phylogenet. Evol.** 59(1): 43–52. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.ympev.2011.01.002. 2011.
- CRAMER, C.A.; LIEDKE, A.M.R.; BONATTO, S.L.; REIS, R.E. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. **Bull. fish Biol.** 9: 51–59. 2007.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Syst. Biol.** 56:879–886. 2007.
- DERIJST, E. Note on the type species of the mailed catfish genus *Hemipsilichthys* Miranda Ribeiro, 1918 (Pisces: Siluriformes; Loricariidae), with the introduction of *Isbrueckerichthys* nom. nov. **Aquarium Wereld** 49: 62–64. 1996.
- DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B. et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology & Evolution**, 22, 1185–1192. 2005.

- DRUMMOND, A.J.; HO, S.Y.W.; PHILLIPS, M.J.; RAMBAUT, A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLoS Biol.** **4**(5): 699–710. doi:10.1371/journal.pbio.0040088. 2006.
- DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Mol. Biol. Evol.** **29**(8): 1969–1973. doi:10.1093/molbev/mss075. 2012.
- DUPUIS, J.R.; ROE, A.D.; SPERLING, F.A.H. Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough. **Mol. Ecol.** **21**: 4422–4436. 2012
- DURAND, J.D.; TEMPLETON, A.R.; GUINAND, B.; IMSIRIDOU, A.; BOUVET, Y. Nested Clade and Phylogeographic Analyses of the Chub, *Leuciscus cephalus* (Teleostei, Cyprinidae), in Greece: Implications for Balkan Peninsula Biogeography. **Mol. Phylogenet. Evol.** **13**(3): 566–580. doi:10.1006/mpev.1999.0671. 1999.
- ENGLBRECHT, C.C.; FREYHOF, J.; NOLTE, A.; RASSMANN, K.; SCHLIEWEN, U.; TAUTZ, D. Phylogeography of the bullhead *Cottus gobio* (Pisces: Teleostei: Cottidae) suggests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations. **Mol. Ecol.** **9**(6): 709–722. doi:10.1046/j.1365-294x.2000.00912.x. 2000.
- ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Catalog of Fishes.** Available from <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> [accessed 2 April 2018]. 2018.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin Ver 3.5.2 User Manual. : 176. 2015.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** **131**(2): 479–491. doi:10.1007/s00424-009-0730-7. 1992.
- FARIA, R.; NAVARRO, A. Chromosomal speciation revisited: Rearranging theory with pieces of evidence. **Trends Ecol. Evol.** **25**(11): 660–669. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.tree.2010.07.008. 2010.
- FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap Author ( s ): Joseph Felsenstein Reviewed work ( s ): Published by: Society for the Study of Evolution Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2408678> . **Evolution (N. Y.)**. **39**(4): 783–791. 1985.



- FINLAY, E.K.; GAILLARD, C.; VAHIDI, S.M. et al. (2007) Bayesian inference of population expansions in domestic bovines. **Biology Letters**, 3, 449–452. 2007.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.** 3(5): 294–299. doi:10.1371/journal.pone.0013102. 1994.
- GRKOVIĆ, A.; VUJIĆ, A.; CHRONI, A.; VAN STEENIS, J.; DJAN, M.; RADENKOVIĆ, S. Taxonomy and systematics of three species of the genus *Eumerus* Meigen, 1822 (Diptera: Syrphidae) new to southeastern Europe. *Zool. Anzeiger-A J. Comp. Zool.* 270: 176–192. Elsevier. 2017.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J.-F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 2.0. **Syst. Biol.** 59(3): 307–321. doi:10.1093/sysbio/syq010. 2010.
- HAILER, F.; KUTSCHERA, V.E.; HALLSTROM, B.M.; KLASSERT, D.; FAIN, S.R.; LEONARD, J.A.; ARNASON, U.; JANKE, A. Nuclear genomic sequences reveal that polar bears are an old and distinct bear lineage. **Science** 336:344–347. 2012
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T.A. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **J. Mol. Evol.** 22(2): 160–174. doi:10.1007/BF02101694. 1985.
- HELED, J.; DRUMMOND, A.J. Bayesian inference of population size history from multiple loci. **BMC Evolutionary Biology**, 8, 289–303. 2008.
- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. Biol. Sci.** 270(1512): 313–21. doi:10.1098/rspb.2002.2218. 2003.
- HEBERT, P.D.N.; STOECKLE, M.Y.; ZEMPLAK, T.S., FRANCIS C.M. Identification of birds through DNA barcodes. **Public Library of Science, Biology**, 2, 1657–1663. 2004.
- HO, S.Y.W.; SHAPIRO, B. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. **Mol Ecol Resour** 11: 423–434. 2011.
- HOLSINGER, K.E.; WEIR, B.S. Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting  $F_{ST}$ . **Nat. Rev. Genet.** 10(9): 639–650. doi:10.1038/nrg2611. 2009.
- HURWOOD, D.A.; HUGHES, J.M. Phylogeography of the freshwater fish, *Mogurnda*

- adpersa, in streams of northeastern Queensland, Australia: evidence for altered drainage patterns. **Mol. Ecol.** 7(11): 1507–1517. doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00469.x. 1998.
- INGENITO, L. F. S.; DUBOC, L.F.; ABILHOA, V.. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arquivos de ciências veterinárias e zoologia da UNIPAR**, 7(1): 23–36. 2004.
- IVANOVA, N.V.; ZEMLAK, T.S.; HANNER, R.H.; HEBERT, D.N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes** 7: 544–548. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x. 2007.
- JARMAN, S.N.; ELLIOTT, N.G. DNA evidence for morphological and cryptic cenozoic speciations in the Anaspididae, “living fossils” from the triassic. **J. Evol. Biol.** 13(4): 624–633. doi:10.1046/j.1420-9101.2000.00207.x. 2000.
- JEREP, F.C.; SHIBATTA, O. A.; PEREIRA, E.H.L.; OYAKAWA, O.T. Two new species of *Isbrueckerichthys* Derijst, 1996 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paranapanema basin, Brazil. **Zootaxa** 68(1372): 53–68. 2006.
- JUSTIN WILKINSON, M.; MARSHALL, L.G.; LUNDBERG, J.G. River behavior on megafans and potential influences on diversification and distribution of aquatic organisms. **J. South Am. Earth Sci.** 21(1–2): 151–172. doi:10.1016/j.jsames.2005.08.002. 2006.
- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity (Edinb)**. 94(2): 180–186. doi:10.1038/sj.hdy.6800595. 2005.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics** 28(12): 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199. 2012.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16(2): 111-120. 1980.
- KINGMAN, J.F.C. On the Genealogy of Large Populations. **Journal of Applied Probability** (19): 27-43. 1982.
- KNOWLES, L.L.; CARSTENS, B.C. Delimiting species without monophyletic gene

- trees. **Syst. Biol.** 56:887–895. 2007.
- KNOWLTON, N. Sibling Species in the Sea. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 24: 189–216. doi:DOI 10.1146/annurev.ecolsys.24.1.189. 1993.
- KOTLÍK, P.; BOGUTSKAYA, N.G.; EKMEKÇI, F.G. Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. **Mol. Ecol.** 13(1): 87–95. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.02021.x. 2004.
- KREISER, B.R.; MITTON, J.B.; WOODLING, J.D. Phylogeography of the plains killifish, *Fundulus zebrinus*. **Evolution (N. Y.)**. 55(2): 339–350. doi:10.1111/j.0014-3820.2001.tb01299.x. 2001.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol. Biol. Evol.** 33(7): msw054. doi:10.1093/molbev/msw054. 2016.
- LANGGANI, F. Revisão do gênero *Neoplecostomus* Eigenmann & Eigenmann, 1888, com a descrição de quatro novas espécies do sudeste brasileiro (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae). **Comum. Mus. Ciênc. PUCRS, sér. Zool** 3: 3–31. 1990.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics** 23(21): 2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404. 2007.
- LEIGH, J.W.; BRYANT, D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution** (6): 1110–1116. doi:10.1111/2041-210X.12410. 2015.
- MARSHALL, D.C.; HILL, K.B.R.; COOLEY, J.R.; SIMON, C. Hybridization, mitochondrial DNA phylogeography, and prediction of the early stages of reproductive isolation: Lessons from New Zealand cicadas (Genus *Kikihia*). **Syst. Biol.** 60(4): 482–502. doi:10.1093/sysbio/syr017. 2011.
- MAYDEN, R.L. Vicariance biogeography, parsimony, and evolution in North American freshwater fishes. **Syst. Biol.** 37(4): 329–355. doi:10.1093/sysbio/37.4.329. 1988.
- MILLER, M.P. Alleles in Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. **J Hered** 96(6): 722–724. 2005.
- MININ, V.N.; BLOOMQUIST, E.W.; SUCHARD, M.A. Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics.

- Molecular Biology and Evolution**, 25, 1459–1471. 2008.
- MONAGHAN, M.T.; WILD, R.; ELLIOT, M.; FUJISAWA, T.; BALKE, M.; INWARD, D.J.G.; LEES, D.C.; RANAIVOSOLO, R.; EGGLETON, P.; BARRACLOUGH, T.G.; VOGLER, A.P. Accelerated species Inventory on Madagascar using coalescent-based models of species Delineation. **Syst. Biol.** **58**(3): 298–311. doi:10.1093/sysbio/syp027. 2009.
- MONTOYA-BURGOS, J.I.; MULLER, S.; WEBER, C.; PAWLOWSKI, J. Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M. & Lucena C.A. S. (Eds), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, Edipucrs, Porto Alegre, pp. 363–3. 1998.
- MUNEEPEERAKUL, R.; BERTUZZO, E.; LYNCH, H.J.; FAGAN, W.F.; RINALDO, A.; RODRIGUEZ-ITURBE, I. Neutral metacommunity models predict fish diversity patterns in Mississippi–Missouri basin. **Nature** **453**(7192): 220–222. doi:10.1038/nature06813. 2008.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant. **Nucleic Acids Res.** **8**: 4321 – 4326. 1980.
- NASCIMENTO, V.D.; COELHO, K.A.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, R.B.; ZIEMNICZAK, K.; CENTOFANTE, L.; PAVANELLI, C.S.; TORRES, R.A.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R. Do multiple karyomorphs and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate chromosomal speciation? **Zool. Anz.** **272**: 93–103. Elsevier GmbH. doi:10.1016/j.jcz.2017.12.006. 2018.
- NELSON, G. A decade of challenge the future of biogeography. **Earth Sciences History**, **4**(2): 187–196. 1985.
- OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; ZANATA, A.M. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Ribeira de Iguape basin, with descriptions of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Zootaxa**, 921: 1–27. 2005.
- PADIAL, J.M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Front. Zool.** **7**: 1–14. doi:10.1186/1742-9994-7-16. 2010.
- PENHA, H. M. Processos endogenéticos na formação do relevo. Pp. 51–92. In: Guerra, A. J. T & S. B. Cunha (Eds.). *Geomorfologia: uma atualização das bases e conceitos*. Rio de Janeiro, Bertrand, 472p. 1998.
- PEREIRA, E.H.L.; OYAKAWA, O.T. *Isbrueckerichthys epakmos*, a new species of

- loricariid catfish from the rio Ribeira de Iguape basin, Brazil (Teleostei: Siluriformes). **Neotrop. Ichthyol.** 1(1): 3–9. doi:10.1590/S1679-62252003000100001. 2003.
- PEREIRA, E. H. L.; REIS, R.E. Revision of the loricariid genera *Hemipsilichthys* and *Isbrueckerichthys* (Teleostei: Siluriformes), with description of five new species of *Hemipsilichthys*. **Ichthyological Exploration of Freshwaters** (13): 97-146. 2002.
- PONS, J.; BARRACLOUGH, T.G.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.; DURAN, D.P.; HAZELL, S.; KAMOUN, S.; SUMLIN, W.D.; VOGLER, A.P. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Syst. Biol.** 55(4): 595–609. doi:10.1080/10635150600852011. 2006.
- POTTER, P.E. The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: A natural history. **Journal of South American Earth Sciences**, 10(5–6): 331–344. 1997.
- PRITCHARD, J.K. Documentation for structure software : Version 2 . 3. **6(3)**: 321–326. doi:10.1002/spe.4380060305. 2010.
- PYBUS, O.G.; RAMBAUT, A.; HARVEY, P.H. An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies. **Genetics**, 155, 1429–1437. 2000.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available from <http://www.r-project.org/>.2013.
- RAMBAUT, A.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; DRUMMOND, A.J. Tracer v1.6. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.2014.
- RAPOSO, M.I.B. Episódios intrusivos no Arco de Ponta Grossa, determinados através de um estudo paleomagnético. **Rev. Bras. Geociências** 25(1): 3–19. 1995.
- REIS, R.E.;WEBER, C.; MALABARBA, L.R. Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from southern Brazil, with descriptions of three new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). **Revue Suisse de Zoologie**, 97(3): 729–766. 1990.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 2003.
- RIBEIRO, A.C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: An example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotrop. Ichthyol.** 4(2): 225–246. doi:10.1590/S1679-62252006000200009. 2006.
- RONQUIST, F., HUELSENBECK, J., TESLENKO, M. MrBayes Version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries. : 1–103. 2011.

- ROXO, F.F.; ALBERT, J.S.; SILVA, G.S.C.; ZAWADZKI, C.H.; FORESTI, F., OLIVEIRA, C. Molecular phylogeny and biogeographic history of the armored neotropical catfish subfamilies hypoptopomatinae, neoplecostominae and otothyriinae (siluriformes: Loricariidae). **PLoS One** **9**(8): 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0105564. 2014.
- ROXO, F.F.; LUJAN, N.K.; TAGLIACOLLO, V.A.; WALTZ, B.T.; SILVA, G.S.C.; OLIVEIRA, C.; ALBERT, J.S. Shift from slow-to fast-water habitats accelerates lineage and phenotype evolution in a clade of Neotropical suckermouth catfishes (Loricariidae: Hypoptopomatinae). **PLoS One** **12**(6): 4–6. doi:10.1371/journal.pone.0178240. 2017.
- ROXO, F.F.; ZAWADZKI, C.H.; DA COSTA SILVA, G.J.; CHIACHIO, M.C.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Molecular systematics of the armored neotropical catfish subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Zootaxa** **42**(3390): 33–42. 2012.
- ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S.E.; SÁNCHEZ-GRACIA, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Mol. Biol. Evol.**: 1–4. doi:10.1093/molbev/msx248. 2017.
- SABAJ, M.H., ARMBRUSTER, J.W., PAGE, L.M. Spawning in *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. **Ichthyol. Explor. Freshwaters** **10**(3): 217–229. Available from [http://www.auburn.edu/academic/science\\_math/res\\_area/loricariid/Armbruster\\_publications/Ancistrus.pdf](http://www.auburn.edu/academic/science_math/res_area/loricariid/Armbruster_publications/Ancistrus.pdf). 1999.
- SACCONE, C.; DE GIORGI, C.; GISSI, C.; PESOLE, G.; REYES, A. Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system. **Gene** **238**(1): 195–209. doi:10.1016/S0378-1119(99)00270-X. 1999.
- SAENZ, C.A.T.; HACKSPACHER, P.C.; NETO, J.C.H.; IUNES, P.J.; GUEDES, S.; RIBEIRO, L.F.B.; PAULO, S.R. Recognition of Cretaceous, Paleocene, and Neogene tectonic reactivation through apatite fission-track analysis in Precambrian areas of southeast Brazil: Association with the opening of the south Atlantic Ocean. **Journal of South American Earth Sciences**, 15: 765–774. 2003. 2003
- SCHAEFER, S.A. Phylogenetic analysis of the loricariid subfamily Hypoptopomatinae (Pisces: Siluroidei: Loricariidae), with comments on generic diagnoses and

- geographic distribution. **Zool. J. Linn. Soc.** **102**(1): 1–41. doi:10.1111/j.1096-3642.1991.tb01535.x. 1991.
- SCHAEFER, S.A. The neotropical cascudinhos: Systematics and biogeography of the *Otocinclus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 148: 1–120. 1997.
- SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos Siluriformes: Loricariidae. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 375–400. 1998.
- SCHLICK-STEINER, B.C.; STEINER, F.M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E.; CROZIER, R.H. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. **Annu. Rev. Entomol.** **55**: 421–438. Annual Reviews. 2010.
- SIMMONS, R.B.; WELLER, S. J. Utility and evolution of cytochrome b in insects. **Mol. Phylogenet. Evol.** **20**, 196–210. 2001.
- SILVA, J. F. P. Two new species of *Bryconamericus* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 2(2): 55–60. 2004.
- SMITH, G.R. Late cenozoic freshwater fishes of north +4191 america. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** **12**: 163–193. 1981.
- STILLER, M.; BARYSHNIKOV, G.; BOCHERENS, H. et al. Withering away – 25 000 years of genetic decline preceded cave bear extinction. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 975–978. 2010.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** **246**(1971): 1971–1973. 1972.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol. Biol. Evol.** **10**(January). doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023. 1993.
- THOMAZ-FILHO, A.; MIZUSAKI, A.M.P.; MILANI, E.J.; CESERO, P. Rifting and magmatism associated with the South America and Africa break up. **Revista Brasileira de Geociências**, 30(1): 17–19. 2000.
- TRAVENZOLI, N.M., SILVA, P.C., SANTOS, U., ZANUNCIO, J.C., OLIVEIRA, C.; DERGAM, J.A. Cytogenetic and molecular data demonstrate that the bryconinae (ostariophysi, bryconidae) species from southeastern Brazil form a phylogenetic and phylogeographic unit. **PLoS One** **10**(9). doi:10.1371/journal.pone.0137843. 2015.

- VARI, R.P.; MALABARBA, L.R. Neotropical Ichthyology: An Overview. *Phylogeny Classif. Neotrop. Fishes* **1870**(January 1998): 1–11. 1998.
- VARI, R. P.; WEITZMAN, S.H. A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America. Pp. 381–393. In: Peters, G. & R. Hutterer (Eds.). *Vertebrates in the Tropics. Proceedings of the International Symposium on Vertebrate Biogeography and Systematics in the Tropics*, Bonn, June 5–8, 1989. Alexander Koenig Zoological Research Institute and Zoological Museum, Bonn, 424p. 1990.
- VARI, R. P.; HAROLD, A.S. Phylogenetic study of the neotropical fish genera *Creagrutus* Günther and *Piabina* Reinhardt (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), with a revision of the cis-andean species. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 613: 1–239. 2001. 2001
- VICARI, M.R., PAZZA, R., ARTONI, R.F., MARGARIDO, V.P.; BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetics and biogeography: Considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguazu river. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **49**(2): 297–303. doi:10.1590/S1516-89132006000300015. 2006.
- VICTORIANO, P.F., MUÑOZ-MENDOZA, C., SÁEZ, P. A, SALINAS, H.F., MUÑOZ-RAMÍREZ, C., SALLABERRY, M., FIBLA, P.; MÉNDEZ, M. A. Evolution and Conservation on Top of the World : Phylogeography of the Marbled Water Frog ( *Telmatobius marmoratus* Species Complex ; Anura , *Telmatobiidae* ) in Protected Areas of Chile. *J. Hered.*: 546–559. doi:10.5061/dryad.kv1hd. 2015.
- VUATAZ, L., SARTORI, M., WAGNER, A.; MONAGHAN, M.T. Toward a DNA taxonomy of alpine rhithrogena (Ephemeroptera: Heptageniidae) using a mixed yule-coalescent analysis of mitochondrial and nuclear DNA. *PLoS One* **6**(5): 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0019728. 2011.
- WARD, R.D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol. Ecol. Resour.* **9**(4): 1077–1085. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02541.x. 2009.
- WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of The Royal Society* **360**: 1847–1857. doi:10.1098/rstb.2005.1716. 2005.
- WATERS, J.M.; ALLIBONE, R.M.; WALLIS, G.P. Geological subsidence, river capture, and cladogenesis of galaxiid fish lineages in central New Zealand. *Biol. J. Linn. Soc.* **88**(3): 367–376. doi:10.1111/j.1095-8312.2004.00622.x. 2006.
- WATERS, J.M.; CRAW, D.; YOUNGSON, J.H.; WALLIS, G.P. Genes meet geology:



- Fish phylogeographic pattern reflects ancient, rather than modern, drainage connections. **Evolution (N. Y.)**. **55**(9): 1844–1851. doi:10.1111/j.0014-3820.2001.tb00833.x. 2001.
- WILL, K.W.; RUBINOFF, D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics** 20:47–55. 2004.
- WILSON, A.C.; CANN, R.L.; CARR, S.M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U.B.; HELM-BYCHOWSKI, K.M.; HIGUCHI, R.G.; PALUMBI, S.R.; PRAGER, E.M.; SAGE, R.D.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biol. J. Linn. Soc.** 26, 375–400. 1985.
- WINEMILLER, K.O., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H., TAPHORN, D.C., NICO, L.G.; DUQUE, A.B. Fish assemblages of the Casiquiare River, a corridor and zoogeographical filter for dispersal between the Orinoco and Amazon basins. **J. Biogeogr.** **35**(9): 1551–1563. doi:10.1111/j.1365-2699.2008.01917.x. 2008.
- ZIEMNICZAK, K.; BARROS, A. V.; ROSA, K.O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; CESTARI, M.M.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): Emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Ital. J. Zool.** **79**(4): 492–501. doi:10.1080/11250003.2012.676677. 2012.