

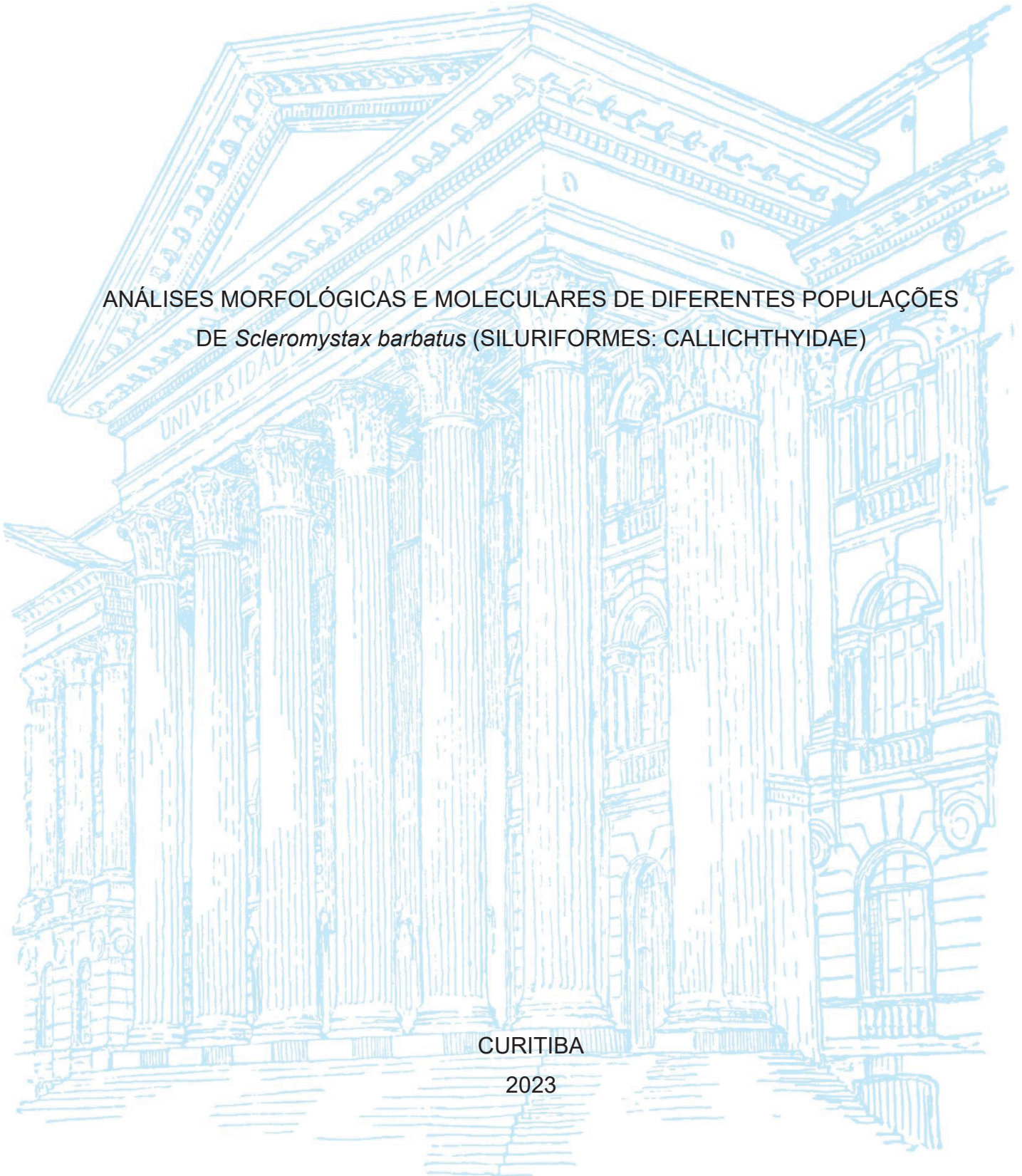
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROGER HENRIQUE DALCIN

ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DE DIFERENTES POPULAÇÕES
DE *Scleromystax barbatus* (SILURIFORMES: CALLICHTHYIDAE)

CURITIBA

2023



ROGER HENRIQUE DALCIN

ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DE DIFERENTES POPULAÇÕES
DE *Scleromystax barbatus* (SILURIFORMES: CALLICHTHYIDAE).

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Abilhoa

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Dalcin, Roger Henrique.

Análises morfológicas e moleculares de diferentes populações de *Scieromystax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae). / Roger Henrique Dalcin. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas.

Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Abilhoa.

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.

1. Zoologia. 2. Cascudo (Peixe). 3. Bagre (Peixe). 4. Espécies. 5. Peixes de água doce. 6. Peixes - Mata Atlântica. 7. Ictiofauna. 8. Biogeografia. I. Abilhoa, Vinícius, 1968-. II. Artoni, Roberto Ferreira. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. IV. Título.

Bibliotecária: Rosilei Vilas Boas CRB-9/939



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA -
40001016008P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ROGER HENRIQUE DALCIN** intitulada: "**Análises morfológicas e moleculares de diferentes populações de *Scleromystax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae)**", sob orientação do Prof. Dr. VINICIUS ABILHOA, que após terem inquirido o aluno e realizada 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, 11 de Julho de 2023.

Assinatura Eletrônica
19/07/2023 15:49:40.0
VINICIUS ABILHOA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 20/07/2023 09:05:02.0 JONATHAN PENA CASTRO Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)	Assinatura Eletrônica 19/07/2023 14:32:27.0 AXEL MAKAY KATZ Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)
Assinatura Eletrônica 19/07/2023 14:12:31.0 MARCELO RIBEIRO DE BRITTO Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)	Assinatura Eletrônica 24/07/2023 15:58:00.0 ROBERTO FERREIRA ARTONI Coordenador(a) (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelos exemplos e valores que me ensinaram, permitindo fazer as escolhas certas desde a minha adolescência e por todo o suporte desde o começo na minha vida na pós-graduação.

Ao meu filho, principal motivação da minha vida, me fazendo seguir sempre em frente.

A Luz por todo apoio, conversa, conselhos, colo e ajuda com todas as análises. Por sempre me acalmar e me dizer que tudo vai dar certo, por sempre me apoiar e ser o meu porto seguro. As coisas se tornaram mais leves graças a você.

A minha querida irmã Emily, ao meu irmão Marcus e aos irmãos que a vida me deu, Matheus e Braz, por toda a preocupação e carinho ao longo desses anos.

Ao professor Pedro, por todas as conversas e conselhos desde o começo da minha graduação, sempre preocupado com a minha formação profissional e acadêmica.

Ao professor Vinícius, por toda paciência, confiança e conselhos. Muito obrigado por aceitar me orientar e por todo o conhecimento transmitido, além de me mostrar que é possível trabalhar de maneira séria e ao mesmo tempo alegre.

A toda a galera do museu, principalmente ao Matheus e Adriano, pelos bons momentos em campo e laboratório.

A todos que me ajudaram durante as coletas, especialmente ao Thiago, Axel e meu querido irmão Marcus.

RESUMO

Scleromystax barbatus é um cascudo com ampla distribuição ao longo de riachos litorâneos da Mata Atlântica e pode ser um modelo interessante para estudos filogeográficos, ajudando a entender a influência de processos evolutivos e geográficos na distribuição atual da ictiofauna desse Bioma. Nossa hipótese é de que o grau de isolamento e a complexidade histórica e geomorfológica das bacias hidrográficas da Mata Atlântica, associadas às glaciações e atividades neotectônicas, tiveram uma grande influência na distribuição atual das populações de *S. barbatus*, provocando descontinuidades e divergências em caracteres morfológicos e genéticos. Foram coletados 211 indivíduos de *S. barbatus* pertencentes as 11 populações ao longo de sua distribuição natural. Amostras de tecido muscular foram retiradas e o DNA foi extraído pelo método salino. O mitogenoma completo de quatro populações de *S. barbatus* foi reconstruído, compreendendo o primeiro estudo com uma espécie pertencente a este gênero e o segundo com espécimes de Corydoradinae amostrados em seu ambiente natural e depositados em coleções permanentes. O mitogenoma de *S. barbatus* é uma molécula circular de 16.694 pares de bases compreendendo 37 genes, dos quais 22 são tRNA, dois são rRNA, 13 são genes codificadores de proteínas e um, uma região de controle (D-loop). Sequências parciais dos genes mitocondriais Cytb e ND4 e o nuclear RAG1 foram utilizadas para análises de variância molecular, estatísticas populacionais par a par Fst, redes de haplótipos, árvores bayesianas e três métodos automatizados de particionamento de linhagem. Análises de morfometria geométrica foram realizadas com imagens do lado esquerdo do corpo, baseadas em 15 marcos anatômicos homólogos a todos os indivíduos e avaliados através das Análises de Componentes Principais e de Variáveis Canônicas e de disparidade morfológica. Para testar a correlação entre as análises filogenéticas e morfológicas, o sinal filogenético foi estimado com uma versão modificada da estatística K. Resultados das análises moleculares e morfológicas indicam que as populações de *S. barbatus* apresentam uma alta divergência molecular e uma baixa diferenciação morfológica, entretanto quatro linhagens evolutivas foram identificadas em ambas as análises. Otólitos *lapillus* foram utilizados para análises de forma (contorno) por meio da utilização de imagens através dos descritores de Fourier e Wavelets. O otólito apresenta forma ovoide, com o *gibbus maculae* ocupando quase a totalidade da parte ventral, semelhante a outros otólitos de Callichthyidae. Foram encontradas diferenças nas formas dos otólitos entre todas as populações estudadas, com exceção das populações provenientes do limite sul da distribuição da espécie.

Palavras-chave: capturas de Cabeceiras; delimitação de espécies; paleodrenagens; peixes de água doce; riachos rosteiros.

ABSTRACT

Scleromystax barbatus is a corydorid with a wide distribution along the coastal streams of the Atlantic Forest and can be an interesting model for phylogeographic studies, helping to understand the influence of evolutionary and geographic processes on the current distribution of the ichthyofauna of this biome. Our hypothesis is that the degree of isolation and the historical and geomorphological complexity of the Atlantic Forest watersheds, associated with glaciations and neotectonic activities, had a great influence on the current distribution of *S. barbatus* populations, causing discontinuities and divergences in morphological and genetic characters. We collected 211 individuals of *S. barbatus* from 11 populations throughout its natural range. Muscle tissue samples were collected and DNA was extracted by the saline method. The complete mitogenome of four populations of *S. barbatus* was reconstructed, the first study with a species belonging to this genus and the second with specimens of Corydoradinae sampled in their natural environment and deposited in permanent collections. The mitogenome of *S. barbatus* is a circular molecule of 16,694 base pairs containing 37 genes, of which 22 are tRNA, two are rRNA, 13 are protein-coding genes and one is a control region (D-loop). Partial sequences of the mitochondrial Cytb and ND4 genes and the nuclear RAG1 gene were used for molecular variance analyses, pairwise F_{st} population statistics, haplotype networks, Bayesian trees, and three automated phylogenetic partitioning methods. Geometric morphometric analyses were performed using images of the left side of the body based on 15 anatomical landmarks homologous to all individuals and evaluated using principal component and canonical variable analyses and morphological disparity. To test the correlation between the phylogenetic and morphological analyses, the phylogenetic signal was estimated using a modified version of the K-statistic. Results of molecular and morphological analyses indicate that *S. barbatus* populations show high molecular divergence and low morphological differentiation, but four evolutionary lineages were identified in both analyses. *Lapillus* otoliths were used for shape (contour) analysis by imaging using Fourier and Wavelets descriptors. The otolith has an ovoid shape with the *gibbus maculae* occupying almost the entire ventral portion, similar to other otoliths in the Callichthyidae. Differences in otolith shape were found among all populations studied, except those from the southern limit of the species' distribution.

Key words: coastal streams; freshwater fishes; headwater captures; paleodrainages; species delimitation.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURE 1 – COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF *Scleromystax barbatus* FROM THE AR POPULATION.36
- FIGURE 2 – PHYLOGENETIC ANALYSIS OF 13 CORYDORADINAE AND *Hoplosternum littorale* (CALLICHTHYINAE MEMBER) SPECIES AS THE OUTGROUP BASED ON THE NUCLEOTIDE SEQUENCES OF 13 PCGS FROM THE MITOCHONDRIAL GENOME. BOOTSTRAP VALUES ARE SHOWN NEXT TO NODES AND THE SCALE BAR SHOWS 0.03 CHANGES.38
- FIGURA 3 – MAPA DAS ÁREAS AMOSTRAIS UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO COM AS POPULAÇÕES OBTIDAS COM DADOS PRIMÁRIOS (PRESENTE ESTUDO) E DADOS SECUNDÁRIOS (ALEXANDROU ET AL., 2011). LEGENDA: AE – RIO AERADO, SP; AR – RIO ARIRÓ, RJ; CU – RIO CUBATÃO, SC; DM – RIO DO MEIO, PR; GU – RIO GUAPIAÇU, RJ; PE – RIO PERNAMBUCO, SC; PM – RIO PEREQUÊ MIRIM, SP; OS – RIO PARAÍBA DO SUL, RJ; SJ – RIO SÃO JOÃO, SC; VR – VALE DO RIBEIRA, SP.51
- FIGURA 4 – POSIÇÃO DOS 15 LANDMARKS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA.58
- FIGURA 5 – DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DE *S. BARBATUS* USANDO OS GENES MITOCONDRIAIS ND4 (A) E CITOCROMO B (B) E O GENE NUCLEAR RAG1 (C). TODOS OS GRUPOS SÃO REPRESENTADOS SEGUINDO O ESQUEMA DE CORES ESTABELECIDO NA FIG. 1.67
- FIGURA 6 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *Scleromystax barbatus* CONSTRUÍDA A PARTIR DOS GENES MITOCONDRIAIS CITOCROMO B + ND4 E O GENE NUCLEAR RAG1. VALORES DE SUPORTE DOS RAMOS ESTÃO REPRESENTADOS EM NÚMEROS ARÁBICOS.71
- FIGURA 7 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *Scleromystax barbatus* CONSTRUÍDA A PARTIR DO GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO B. VALORES DE SUPORTE DOS RAMOS ESTÃO REPRESENTADOS EM NÚMEROS ARÁBICOS.72

- FIGURA 8 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *Scleromystax barbatus* CONSTRUÍDA A PARTIR DO GENE MITOCONDRIAL ND4. VALORES DE SUPORTE DOS RAMOS ESTÃO REPRESENTADOS EM NÚMEROS ARÁBICOS.....72
- FIGURA 9 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *Scleromystax barbatus* CONSTRUÍDA A PARTIR DO GENE NUCLEAR RAG1. VALORES DE SUPORTE DOS RAMOS ESTÃO REPRESENTADOS EM NÚMEROS ARÁBICOS...74
- FIGURA 10 – RESULTADO DOS MODELOS DE DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIE PARA CADA GENE UTILIZADO. ASAP (ASSEMBLE SPECIES BY AUTOMATIC PARTITIONING); GMYC (GENERALIZED MODEL YULE COALESCENCE); PTP (POISON TREE PROCESSES).....77
- FIGURA 11 – ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS ENTRE EXEMPLARES FÊMEAS DAS POPULAÇÕES DE *Scleromystax barbatus*. TODOS OS GRUPOS SÃO REPRESENTADOS SEGUINDO O ESQUEMA DE CORES ESTABELECIDO NA FIG. 1.....78
- FIGURA 12 – ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS ENTRE EXEMPLARES MACHOS DAS POPULAÇÕES DE *Scleromystax barbatus*. TODOS OS GRUPOS SÃO REPRESENTADOS SEGUINDO O ESQUEMA DE CORES ESTABELECIDO NA FIG. 1.....79
- FIGURA 13 – ANÁLISE DE VARIÁVEIS CANÔNICAS (AVC) PARA AS FÊMEAS MOSTRANDO A DIFERENCIAÇÃO ENTRE GRUPOS DEFINIDOS A PRIORI (POPULAÇÕES), ELIPSES DE CONFIANÇA DE 80% SÃO MOSTRADAS PARA CADA GRUPO. TODOS OS GRUPOS SÃO REPRESENTADOS SEGUINDO O ESQUEMA DE CORES ESTABELECIDO NA FIG. 1.....80
- FIGURA 14 – ANÁLISE DE VARIÁVEIS CANÔNICAS (AVC) PARA OS MACHOS MOSTRANDO A DIFERENCIAÇÃO ENTRE GRUPOS DEFINIDOS A PRIORI (POPULAÇÕES), ELIPSES DE CONFIANÇA DE 80% SÃO MOSTRADAS PARA CADA GRUPO. TODOS OS GRUPOS SÃO REPRESENTADOS SEGUINDO O ESQUEMA DE CORES ESTABELECIDO NA FIG. 1.....81
- FIGURA 15 – ANÁLISE DE VARIÁVEIS CANÔNICAS (AVC) PARA AS FÊMEAS MOSTRANDO A DIFERENCIAÇÃO ENTRE GRUPOS DEFINIDOS A PRIORI (CLADOS), ELIPSES DE CONFIANÇA DE 80% SÃO

MOSTRADAS PARA CADA GRUPO. A REPRESENTAÇÃO DO CORPO SEGUE A LEGENDA DAS ANÁLISES CANÔNICAS E A FORMA MÉDIA DE TODAS AS FÊMEAS É DESTACADO EM CINZA. OS CLADOS FORAM ESTABELECIDOS DE ACORDO COM A FIG. 6.....82

FIGURA 16 – ANÁLISE DE VARIÁVEIS CANÔNICAS (AVC) PARA OS MACHOS MOSTRANDO A DIFERENCIAÇÃO ENTRE GRUPOS DEFINIDOS A PRIORI (CLADOS), ELIPSES DE CONFIANÇA DE 80% SÃO MOSTRADAS PARA CADA GRUPO. A REPRESENTAÇÃO DO CORPO SEGUE A LEGENDA DAS ANÁLISES CANÔNICAS E A FORMA MÉDIA DE TODAS AS FÊMEAS É DESTACADO EM CINZA. OS CLADOS FORAM ESTABELECIDOS DE ACORDO COM A FIG. 6.....83

FIGURA 17 – FILOMORFOESPAÇO MOSTRANDO A NÃO CORRELAÇÃO ENTRE AS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E VARIAÇÃO DA FORMA NO MORFOESPAÇO PARA AS FÊMEAS DE *Scleromystax barbatus*. CADA PONTO REPRESENTA A FORMA MÉDIA DE UMA POPULAÇÃO.....87

FIGURA 18 – FILOMORFOESPAÇO MOSTRANDO A NÃO CORRELAÇÃO ENTRE AS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E VARIAÇÃO DA FORMA NO MORFOESPAÇO PARA OS MACHOS DE *Scleromystax barbatus*. CADA PONTO REPRESENTA A FORMA MÉDIA DE UMA POPULAÇÃO.....88

FIGURA 19 – CONSENSO FINAL DOS RESULTADOS OBTIDOS. A) IMAGEM MOSTRANDO AS DRENAGENS COSTEIRAS DO SUL E SUDESTE DO BRASIL SEGUINDO AS PALEODRENAGENS PROPOSTAS POR THOMAZ et al., 2018; OS QUADRADOS REPRESENTAM OS LOCAIS DAS COLETAS E OS NÚMEROS REPRESENTAM AS PALEODRENAGENS ONDE AS POPULAÇÕES ESTUDADAS ESTÃO INSERIDAS. B) RESULTADO DA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIE PARA CADA GENE UTILIZADO (CITOCROMO B, ND4 E RAG1 E MODELOS UTILIZADOS ASAP (ASSEMBLE SPECIES BY AUTOMATIC PARTITIONING); GMYC (GENERALIZED MODEL YULE COALESCENCE); PTP (POISON TREE PROCESSES). C)

	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA PARA MACHOS E FÊMEAS DE ACORDO COM AS ANÁLISES CANÔNICAS (CVA) E DISPARIDADE MORFOLÓGICA (MD). NO FINAL CONSTA NOSSO CONSENSO FINAL (FINAL OTUs).....	95
FIGURE 20	– GEOGRAPHIC LOCATION OF THE <i>Scleromystax barbatus</i> POPULATION SAMPLING POINTS IN COASTAL ATLANTIC RAINFOREST RIVERS APPLIED HEREIN.....	110
FIGURE 21	– VENTRAL VIEW OF THE LEFT LAPILLUS IN OTOLITHS SAMPLED FROM <i>Scleromystax barbatus</i> POPULATIONS FROM COASTAL ATLANTIC RAINFOREST RIVERS. ABBREVIATIONS ARE LISTED TABLE 1. A (ANTERIOR), M (MEDIAL).....	113
FIGURE 22	– MEAN OTOLITH SHAPE BASED ON THE FOURIER (A) AND WAVELET (B) RECONSTRUCTIONS FOR EACH <i>Scleromystax barbatus</i> POPULATION FROM COASTAL ATLANTIC RAINFOREST RIVERS. DEGREES (°) REPRESENT ANGLES IN POLAR COORDINATES CONCERNING THE WAVELET ANALYSIS.....	114
FIGURE 23	– OTOLITH SHAPES OF <i>Scleromystax barbatus</i> POPULATIONS FROM COASTAL ATLANTIC RAINFOREST RIVERS EMPLOYING A CANONICAL ANALYSIS OF PRINCIPAL COORDINATES APPLIED TO FOURIER (A) AND WAVELET (B) COEFFICIENTS. BOLD LETTERS REPRESENT THE MEAN CANONICAL COORDINATES SURROUNDING THE STANDARD ERROR FOR EACH POPULATION.....	115
FIGURE 24	– COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF <i>Scleromystax barbatus</i> FROM THE AE POPULATION.....	147
FIGURE 25	– COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF <i>Scleromystax barbatus</i> FROM THE PE POPULATION.....	148
FIGURE 26	– COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF <i>Scleromystax barbatus</i> FROM THE PS POPULATION.....	148

LISTA DE TABELAS

TABLE 1 – CODE USED IN THE ANALYSIS OF <i>S. BARBATUS</i> POPULATIONS, LOCALITY, RIVER, COORDINATES WHERE THE COLLECTIONS WERE CARRIED OUT AND VOUCHER.	33
TABLE 2 – SPECIES USED FROM GENBANK AND THE PRESENT STUDY AND THEIR RESPECTIVE ACCESSION AND SOURCE NUMBERS.	34
TABLE 3 – NUCLEOTIDE COMPOSITION OF THE FOUR <i>S. BARBATUS</i> POPULATIONS USED IN THIS STUDY. %T (THYMINE PERCENTAGE), %C (CYTOSINE PERCENTAGE), %A (ADENINE PERCENTAGE), %G (GUANINE PERCENTAGE), %GC CONTENT (GUANINE AND CYTOSINE PERCENTAGES).....	36
TABLE 4 – ANNOTATION OF THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF A <i>S. BARBATUS</i> INDIVIDUAL BELONGING TO THE AR POPULATION.	36
TABELA 5 – CÓDIGO UTILIZADO NAS ANÁLISES, LOCALIDADE, RIO E COORDENADAS ONDE FORAM REALIZADOS AS COLETAS E NÚMERO DE INDIVÍDUOS UTILIZADOS PARA O GENOMA MITOCONDRIAL (MITG) E EM CADA GENE.....	53
TABELA 6 – MODELO DE SUBSTITUIÇÃO SELECIONADO USANDO CRITÉRIOS DE INFORMAÇÃO BAYESIANO (BIN) E CRITÉRIO DE INFORMAÇÃO DE AKAIKE (AICC) PARA CADA GENE UTILIZADO NAS ANÁLISES. ABREVIACÕES: +G= DISTRIBUIÇÃO GAMA, +I = LOCAIS INVARIÁVEIS EVOLUTIVAMENTE, HKY= HASEGAWA-KISHINO-YANO, JC= JUKES-CANTOR, K2= KIMURA 2-PARAMETER, TN93= TAMURA-NEI, T92: TAMURA 3-PARAMETER	55
TABELA 7 – CÓDIGO UTILIZADO NAS ANÁLISES, LOCALIDADE, RIO E COORDENADAS ONDE FORAM REALIZADOS AS COLETAS E NÚMERO DE INDIVÍDUOS DE CADA POPULAÇÃO POR SEXO....	57
TABELA 8 – LANDMARKS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES.	59

TABELA 9 – DIVERSIDADE NUCLEOTIDICA E ÍNDICES DE FU'S FS E TAJIMA'S D PARA O GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO B PARA CADA POPULAÇÃO.....	62
TABELA 10 – DIVERSIDADE NUCLEOTIDICA E ÍNDICES DE FU'S FS E TAJIMA'S D PARA O GENE MITOCONDRIAL ND4 PARA CADA POPULAÇÃO.	62
TABELA 11 – DIVERSIDADE NUCLEOTIDICA E ÍNDICES DE FU'S FS E TAJIMA'S D PARA O GENE NUCLEAR RAG1.	62
TABELA 12 – ANÁLISE DA VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) USANDO O GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO B, ND4 E NUCLEAR RAG1.....	63
TABELA 13 – ESTATÍSTICAS POPULACIONAIS PAR A PAR FST PARA O GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO B. DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS (P = < 0,05) SÃO MOSTRADOS NA DIAGONAL ACIMA COM O SÍMBOLO +.....	64
TABELA 14 – ESTATÍSTICAS POPULACIONAIS PAR A PAR FST PARA O GENE MITOCONDRIAL ND4. DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS (P = < 0,05) SÃO MOSTRADOS NA DIAGONAL ACIMA COM O SÍMBOLO +.	64
TABELA 15 – ESTATÍSTICAS POPULACIONAIS PAR A PAR FST PARA O GENE NUCLEAR RAG1. DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS (P = < 0,05) SÃO MOSTRADOS NA DIAGONAL ACIMA COM O SÍMBOLO +.....	65
TABELA 16 – ESTIMATIVAS DE DIVERGÊNCIA EVOLUTIVA SOBRE PARES DE SEQUÊNCIAS ENTRE AS POPULAÇÕES DE <i>S. barbatus</i> ESTUDADAS PARA O GENE CITOCROMO B. VALORES DESTACADOS EM VERMELHO INDICAM UMA DIFERENCIAÇÃO MAIOR QUE 2%.	65
TABELA 17 – ESTIMATIVAS DE DIVERGÊNCIA EVOLUTIVA SOBRE PARES DE SEQUÊNCIAS ENTRE AS POPULAÇÕES DE <i>S. barbatus</i> ESTUDADAS PARA O GENE ND4. VALORES DESTACADOS EM VERMELHO INDICAM UMA DIFERENCIAÇÃO MAIOR QUE 2%.	66
TABELA 18 – ESTIMATIVAS DE DIVERGÊNCIA EVOLUTIVA SOBRE PARES DE SEQUÊNCIAS ENTRE AS POPULAÇÕES DE <i>S. barbatus</i> ESTUDADAS PARA O GENE RAG1. VALORES DESTACADOS EM VERMELHO INDICAM UMA DIFERENCIAÇÃO MAIOR QUE 2%.	66

TABELA 19 – QUANTIDADE DE ESPÉCIES ESTIPULADA PARA CADA MODELO DE DELIMITAÇÕES DE ESPÉCIES E PARA CADA GENE UTILIZADO NO PRESENTE ESTUDO. ASAP (ASSEMBLE SPECIES BY AUTOMATIC PARTITIONING), GMYC (GENERALIZED MODEL YULE COALESCENT) E PTP (POISON TREE PROCESS).....	76
TABELA 20 – VALIDAÇÃO CRUZADA DE JACKKNIFED BASEADA NOS ESCORES DAS VARIÁVEIS CANÔNICAS PARA TODO O CONJUNTO DE DADOS DE 15 MARCOS ANATÔMICOS DAS FÊMEAS. CADA VALOR REPRESENTA A PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES ATRIBUÍDOS AOS GRUPOS DEFINIDOS NO AVC. OS ESPÉCIMES QUE NÃO FORAM ATRIBUÍDOS A NENHUM DOS GRUPOS SÃO TRATADOS COMO OUTLIERS COLOCADOS NA COLUNA “OUTLIER”.	80
TABELA 21 – VALIDAÇÃO CRUZADA DE JACKKNIFED BASEADA NOS ESCORES DAS VARIÁVEIS CANÔNICAS PARA TODO O CONJUNTO DE DADOS DE 15 MARCOS ANATÔMICOS DOS MACHOS. CADA VALOR REPRESENTA A PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES ATRIBUÍDOS AOS GRUPOS DEFINIDOS NO AVC. OS ESPÉCIMES QUE NÃO FORAM ATRIBUÍDOS A NENHUM DOS GRUPOS SÃO TRATADOS COMO OUTLIERS COLOCADOS NA COLUNA “OUTLIER”.	81
TABELA 22 – VALIDAÇÃO CRUZADA DE JACKKNIFED BASEADA NOS ESCORES DAS VARIÁVEIS CANÔNICAS PARA TODO O CONJUNTO DE DADOS DE 15 MARCOS ANATÔMICOS DAS FÊMEAS. CADA VALOR REPRESENTA A PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES ATRIBUÍDOS AOS GRUPOS DEFINIDOS NO AVC. ...	83
TABELA 23 – VALIDAÇÃO CRUZADA DE JACKKNIFED BASEADA NOS ESCORES DAS VARIÁVEIS CANÔNICAS PARA TODO O CONJUNTO DE DADOS DE 15 MARCOS ANATÔMICOS DOS MACHOS. CADA VALOR REPRESENTA A PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES ATRIBUÍDOS AOS GRUPOS DEFINIDOS NO AVC. OS ESPÉCIMES QUE NÃO FORAM ATRIBUÍDOS A NENHUM DOS GRUPOS SÃO TRATADOS COMO OUTLIERS COLOCADOS NA COLUNA “OUTLIER”.	84

TABELA 24 – DISPARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE AS FÊMEAS DAS POPULAÇÕES DE <i>S. barbatus</i> . VALORES SIGNIFICATIVOS DE P (< 0,05) ESTÃO DESTACADOS EM NEGRITO.	84
TABELA 25 – DISPARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE OS MACHOS DAS POPULAÇÕES DE <i>S. barbatus</i> . VALORES SIGNIFICATIVOS DE P (< 0,05) ESTÃO DESTACADOS EM NEGRITO.	85
TABELA 26 – DISPARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE AS FÊMEAS DOS CLADOS DE <i>S. barbatus</i> . VALORES SIGNIFICATIVOS DE P (< 0,05) ESTÃO DESTACADOS EM NEGRITO. OS CLADOS FORAM ESTABELECIDOS DE ACORDO COM A FIG. 6.....	85
TABELA 27 – DISPARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE OS MACHOS DOS CLADOS DE <i>S. barbatus</i> . VALORES SIGNIFICATIVOS DE P (< 0,05) ESTÃO DESTACADOS EM NEGRITO. OS CLADOS FORAM ESTABELECIDOS DE ACORDO COM A FIG. 6.....	86
TABLE 28 – <i>Scleromystax barbatus</i> POPULATION SAMPLING SITES IN COASTAL ATLANTIC RAINFOREST RIVERS, NUMBER OF INDIVIDUALS (N) AND VOUCHER NUMBERS.....	111
TABLE 29 – ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA-LIKE) PERMUTATION TEST FOR FOURIER COEFICIENTES CONCERNING OTOLITH SHAPE AMONG <i>Scleromystax barbatus</i> POPULATIONS FROM COASTAL ATLANTIC RAINFOREST RIVERS.	116
TABLE 30 – ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA-LIKE) PERMUTATION TEST FOR WAVELET COEFICIENTES CONCERNING OTOLITH SHAPE AMONG <i>Scleromystax barbatus</i> POPULATIONS FROM COASTAL ATLANTIC RAINFOREST RIVERS.	116
TABLE 31 – ANNOTATION OF THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF A <i>S. barbatus</i> INDIVIDUAL BELONGING TO THE AE POPULATION.	144
TABLE 32 – ANNOTATION OF THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF A <i>S. barbatus</i> INDIVIDUAL BELONGING TO THE PE POPULATION.	145
TABLE 33 – ANNOTATION OF THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF A <i>S. barbatus</i> INDIVIDUAL BELONGING TO THE PS POPULATION.	146

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 JUSTIFICATIVA	22
1.2 OBJETIVOS	23
1.2.1 Objetivo geral	23
1.2.2 Objetivos específicos.....	23
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 1 COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF FOUR SCLEROMYSTAX BARBATUS (SILURIFORMES: CALLICHTHYIDAE)	
POPULATIONS	29
1 INTRODUCTION	31
2 MATERIAL AND METHODS	33
2.1 SPECIMEN SAMPLINGS.....	33
2.2 SEQUENCING AND MITOGENOME ASSEMBLY	33
2.3 PHYLOGENETIC ANALYSIS.....	34
3 RESULTS	35
4 DISCUSSION	39
REFERENCES	41
1 INTRODUÇÃO	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM.....	50
2.2 ANÁLISES MOLECULARES.....	51
2.2.1 Obtenção do genoma mitocondrial e escolha dos genes analisados	51
2.2.2 Extração de DNA e amplificação	53
2.2.3 Alinhamento das sequências e seleção dos modelos de substituição de nucleótideos	54
2.2.4 Análises populacionais	55
2.2.5 Análises filogenéticas e delimitação de espécies	56
2.3 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA	57
3 RESULTADOS	61
3.1 ANÁLISES POPULACIONAIS.....	61
3.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES	68
3.3 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	78

4 DISCUSSÃO	90
REFERÊNCIAS	96
CAPÍTULO 3 DISCRIMINATING <i>SCLEROMYSTAX BARBATUS</i> (SILURIFORMES: CALLICHTHYIDAE) POPULATIONS FROM ATLANTIC RAINFOREST RIVERS EMPLOYING OTOLITH SHAPE	105
1 INTRODUCTION	107
2 MATERIAL AND METHODS	110
2.1 STUDY AREA	110
2.2 DATA COLLECTION	111
2.3 DATA ANALYSES.....	111
3 RESULTS	113
4 DISCUSSION	117
REFERENCES	120
CONCLUSÃO GERAL	126
REFERÊNCIAS	128
ANEXO 1 ANNOTATION OF THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF A <i>SCLEROMYSTAX BARBATUS</i>	144
ANEXO 2 MITOCHONDRIAL GENOMES OF THE THREE POPULATIONS OF <i>SCLEROMYSTAX BARBATUS</i>	147

1 INTRODUÇÃO GERAL

A região biogeográfica Neotropical se estende desde o Sul do México até o extremo sul da Argentina (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020). Devido a sua grande extensão, apresenta uma ampla variedade de climas (tropical, temperado e de altitude) e ecossistemas, com uma grande diversidade de organismos, incluindo os peixes de água doce (ANTONELLI *et al.*, 2018).

Os peixes de água doce da região neotropical representam cerca de 25% de toda a ictiofauna conhecida no mundo (MALABARBA; MALABARBA, 2019), esta representada por cerca de sete mil espécies conhecidas (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020). Estudos indicam que a riqueza de peixes neotropicais de água doce pode alcançar entre 8 a 9 mil espécies (REIS *et al.*, 2016). Grande parte desta diversidade (77%) pertence a um grupo natural (clado) conhecido como Otophysi, representado na região por Characiformes, Gymnotiformes e Siluriformes, grupo originário na água doce cuja distribuição de seus representantes está concentrada nos ambientes de água doce (ALBERT; REIS, 2012). Os demais grupos representativos da ictiofauna neotropical são considerados secundários, compostos por peixes de água doce cuja origem ocorreu em ambientes marinhos ou estuarinos, como as ordens Cichliformes e Cyprinodontiformes (CASTRO; POLAZ, 2019; MALABARBA; MALABARBA, 2019). A cinco ordens citadas acima representam 87% da ictiofauna conhecida da região, e os demais grupos pertencem a outras 34 ordens (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020; REIS *et al.*, 2016).

Os peixes da ordem Siluriformes em sua maioria são encontrados em ambientes de água doce, com exceção de algumas espécies das famílias Ariidae e Plotosidae, e são encontrados em todos os continentes, exceto o Australiano (MALABARBA; MALABARBA, 2019). A superfamília Loricarioidea representa 40% dos peixes da ordem Siluriformes com mais de 1500 espécies (Eschmeyer; Fong, 2023). Essa superfamília é um clado monofilético composto atualmente pelas famílias Astroblepidae, Callichthyidae, Loricariidae, Nematogenyidae, Scoloplacidae e Trichomycteridae (DE PINNA, 1998), sendo que Loricariidae, com 1044 espécies, e Trichomycteridae, com 412 espécies, são as maiores (ESCHMEYER *et al.*, 2023).

A família Callichthyidae é o terceiro maior grupo em diversidade de Loricarioidea, atualmente com 224 espécies (ESCHMEYER *et al.*, 2023). Os representantes desta família podem ser distinguidos de outros Siluriformes pela

presença de duas séries de placas ósseas longitudinais cobrindo toda a região lateral do corpo e pela disposição dos barbilhões (maxilar e mentoniano) na junção dos lábios (REIS, 1998). Os Callichthyidae são conhecidos popularmente como cascudinhos, coridoras ou tamuatás, e são exclusivos de drenagens do continente sul americano, possuindo uma ampla distribuição ao longo do continente, com exceção dos corpos hídricos localizados no Chile, habitando tanto ambientes lóticos como lênticos e diferentes habitats como fundos dos rios, coluna da água ou então junto a vegetação marginal (REIS, 2003). Todas as espécies da família possuem respiração acessória através do epitélio altamente vascularizado do intestino (GEE; GRAHAM, 1978), permitindo que algumas espécies sejam encontradas em ambientes com baixo teor de oxigênio na água como regiões pantanosas ou até mesmo antropizadas (CUNICO *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2013; POMPEU; ALVES; CALLISTO, 2005).

A família Callichthyidae compreende um grupo monofilético atualmente dividido em duas subfamílias. A subfamília Callichthyinae é a menor, com cinco gêneros e 17 espécies: *Callichthys* Scopoli, 1777 (quatro espécies), *Dianema* Cope, 1871 (duas espécies), *Hoplosternum* Gill, 1858 (três espécies), *Leptoplosternum* Reis, 1997 (seis espécies) e *Megalechis* Reis, 1997 (duas espécies). A subfamília Corydoradinae apresenta três gêneros e 206 espécies: *Aspidoras* Ihering, 1907 (18 espécies), *Corydoras* Lacepède 1803 (186 espécies) e *Scleromystax* Günther, 1864 (seis espécies) (ESCHMEYER *et al.*, 2023). A subfamília Corydoradinae pode ser diferenciada de Callichthyinae pelo corpo mais alto, barbilhões maxilares pequenos e indivíduos de pequeno porte (> 90 mm) (BRITTO, 2003). De acordo com as análises moleculares propostas por Alexandrou *et al.* (2011), a subfamília Corydoradinae é composta por nove linhagens.

O nome *Scleromystax* foi proposto inicialmente por Günther (1864) como um subgênero para separar *Callichthys barbatus* das demais espécies, sendo posteriormente elevado ao nível de gênero por Eigenmann & Eigenmann (1888). Ambos estudos utilizaram a presença de odontódeos na região lateral da cabeça dos machos como caráter diagnóstico da espécie. Baseado em dez caracteres morfológicos, Gosline (1940) realizou uma revisão da família Callichthyidae e, como resultado, sinonimizou os gêneros *Osteogaster* e *Scleromystax* com *Corydoras*.

Somente em 2003 uma nova análise filogenética da subfamília Corydoradinae foi realizada por Britto (2003), baseada em 83 caracteres

morfológicos e 63 espécies. Como resultado, o autor propôs *Corydoras* como um grupo não monofilético e, para tentar resolver esse problema, propôs a sinonimização de *Bronchis* com *Corydoras*, além da revalidação do gênero *Scleromystax*, que passou a incluir *Scleromystax barbatus* (Quoy & Gaimard 1824), *Scleromystax macropterus* (Regan 1913) e *Scleromystax prionotos* (Nijssen & Isbrücker 1980). O monofiletismo de *Scleromystax* foi corroborada por trabalhos baseados em dados moleculares (ALEXANDROU et al., 2011; MARBURGER et al., 2018).

Após *Scleromystax* ser revalidado, duas novas espécies foram descritas para o gênero; *Scleromystax salmacis* Britto & Reis, 2005 e *Scleromystax reisi* Britto, Fukakusa & Malabarba, 2016, ambas distribuídas em drenagens costeiras na porção sul da Mata Atlântica, aumentando a distribuição conhecida do gênero (BRITTO; FUKAKUSA; MALABARBA, 2016; BRITTO; REIS, 2005). Recentemente, após uma revisão das espécies de *Aspidoras*, Tencatt et al. (2022) realocou *Aspidoras virgulatus* (Nijssen & Isbrücker 1980) em *Scleromystax*. Atualmente, *Scleromystax* é considerado um gênero válido e abriga seis espécies (ESCHMEYER; FONG, 2023) distribuídas em riachos costeiros da Mata Atlântica entre os estados do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (BRITTO; FUKAKUSA; MALABARBA, 2016; MENEZES et al., 2007).

O calictídeo *Scleromystax barbatus* é a espécie tipo do gênero e possui a maior distribuição entre as espécies de *Scleromystax*, ocorrendo desde a bacia do rio Paraíba do Sul no estado do Rio de Janeiro até a bacia do Itapocu no norte do estado de Santa Catarina (MENEZES et al., 2007). Este táxon se difere das outras espécies do grupo pela larga faixa negra longitudinal, desde a cabeça até a base dos raios da nadadeira caudal e a cabeça possuindo um padrão de estrias negras reticuladas sobre fundo branco (OYAKAWA et al., 2006). Exibe um acentuado dimorfismo sexual onde os machos adultos apresentam os odontódeos nas regiões laterais da cabeça, espinhos das nadadeiras dorsal e peitorais mais alongados (BRITTO, 2003).

Apesar das poucas informações sobre a história natural da espécie, que indicam que indivíduos de *S. barbatus* são onívoros e especuladores de substrato (ESTEVES; LOBÓN-CERVIÁ, 2001; GONÇALVES; CESTARI, 2013), vivendo em pequenos cardumes em locais rasos de riachos de águas claras, com correnteza fraca a moderada e substrato argiloso ou arenoso (ARANHA; TAKEUTI;

YOSHIMURA, 1998; GONÇALVES; BRAGA, 2013; GONÇALVES; CESTARI, 2013), este cascudinho é comumente registrado em inventários ao longo da sua distribuição nas drenagens costeiras brasileiras (ABILHOA; BASTOS, 2009; DE BRITO; BUCKUP, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2017; PINHEIRO; DALCIN; BATISTA, 2017). A ampla distribuição e o isolamento entre as populações indicam que a espécie é um interessante modelo para os estudos biogeográficos que integrem o uso de ferramentas morfológicas e genéticas.

A taxonomia integrativa, que utiliza dados obtidos de diferentes formas, como informações ecológicas, genéticas e morfológicas de um determinado grupo, pode direcionar a uma melhor decisão na descrição e delimitação de uma espécie (PADIAL *et al.*, 2010), principalmente para complexos de espécies crípticas (PADIAL; DE LA RIVA, 2009; PAPAKOSTAS *et al.*, 2016; SØRENSEN *et al.*, 2020; TAN *et al.*, 2010). Estudos utilizando a taxonomia integrativa tem se tornado comum nos últimos anos para um melhor entendimento da distribuição atual das espécies de peixes na região neotropical, sendo que as principais ferramentas utilizadas são medidas tradicionais da forma do corpo, morfometria geométrica, estruturas como otólitos e dados moleculares, preferencialmente mitocondriais (COSTA-SILVA *et al.*, 2015; GARAVELLO *et al.*, 2021; IBAÑEZ *et al.*, 2022; PUGEDO *et al.*, 2016).

Os avanços das técnicas de sequenciamento e análises de dados moleculares estão se tornando cada vez mais uma ferramenta importante para os estudos de delimitações de espécies, principalmente para aquelas que apresentam pouca diferença morfológica entre populações isoladas (ROCHA-REIS *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2018), sendo que devido a sua rápida evolução e pequeno tamanho, o DNA mitocondrial vem sendo o mais utilizado, principalmente o gene Cytochrome C Oxidase Subunidade I (COI) (HARRISON, 1989; HEBERT *et al.*, 2003; ZHANG; GAO; ZHANG, 2022). No entanto, estudos utilizando um único marcador são mais propensos a erros quando comparados com trabalhos que usam diferentes genes ou região genômicas (WIENS; KUCZYNSKI; STEPHENS, 2010; XIAO *et al.*, 2010).

De fato, alguns estudos realizados com peixes que possuem uma ampla distribuição ao longo dos riachos costeiros da mata atlântica utilizando uma abordagem integrativa com análises morfológicas e genéticas com diferentes genes, revelaram que algumas espécies apresentam uma alta divergência genética e muitas vezes baixa variação morfológica entre as populações geograficamente isoladas (ARGOLO *et al.*, 2020; SANTOS DE LUCENA *et al.*, 2022; SOUTO-

SANTOS; JENNINGS; BUCKUP, 2022), sugerindo que algumas espécies podem representar um complexo de espécies.

No presente estudo buscamos entender as relações e divergências morfológicas e moleculares entre as diferentes populações de *Scleromystax barbatus* ao longo de sua distribuição natural, incluindo material próximo de sua localidade tipo, utilizando uma abordagem integrativa por meio da forma otólitos, medidas corporais e sequências de dois genes mitocondriais (Cytb e ND4) e um gene nuclear (RAG1). A tese foi dividida em três capítulos: CAPÍTULO 1 - Complete mitochondrial genome of four *Scleromystax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae) populations, CAPÍTULO 2 Taxonomia integrativa de diferentes populações de *Scleromystax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae), CAPÍTULO 3 Discrimination of populations of *Scleromystax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae) from rivers of the Atlantic Forest using otolith morphometry. Esperamos responder as seguintes perguntas: (1) Qual o número de espécies/linhagens dentro do complexo *Scleromystax barbatus*? Como as diferentes populações estão relacionadas entre si? Existe diferença entre a forma dos otólitos e/ou entre a forma do corpo entre as populações?

1.1 JUSTIFICATIVA

Dados moleculares indicam que a maior parte da diversificação da ictiofauna da mata atlântica ocorreu em um período geológico recente (THOMAZ *et al.*, 2015; THOMAZ; MALABARBA; KNOWLES, 2017) e que muitas espécies, com ampla distribuição por todo esse bioma, podem representar na verdade um complexo de espécies.

O uso de diversas técnicas para a delimitação de espécies é fundamental para a resolução de complexos taxonômicos, como espécies crípticas e processos recentes de especiação.

Entender as relações taxonômicas entre as diferentes populações de *S. barbatus* é importante para o entendimento do processo evolutivo do gênero *Scleromystax*, que é um dos poucos gêneros de peixes endêmicos e restritos a Mata Atlântica (BRITTO, 2003; BRITTO; FUKAKUSA; MALABARBA, 2016), fornecendo evidências importantes que podem auxiliar na compreensão evolutiva de outros táxons da Mata Atlântica.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Analisar diferentes populações de *Scleromytax barbatus* de riachos costeiros da Mata Atlântica por meio de abordagens moleculares e morfológicas.

1.2.2 Objetivos específicos

- * Comparar as sequências do gene mitocondrial citocromo b e ND4 e o gene nuclear rag1 por meio de diferentes ferramentas moleculares para testar as semelhanças/diferenças entre as diferentes populações de *Scleromytax barbatus*.
- * Analisar a variação na forma do corpo entre populações de *Scleromytax barbatus* através de morfometria geométrica.
- * Analisar a variação morfológica de otólitos entre populações de *Scleromytax barbatus* por meio dos coeficientes de Fourier e Wavelets.
- * Comparar as diferentes abordagens metodológicas utilizadas neste estudo para compreender as relações taxonômicas de *Scleromytax barbatus*.
- * Contribuir com informações para uma melhor compreensão do processo evolutivo e da filogeografia do gênero *Scleromytax*.

REFERÊNCIAS

- ABILHOA, V.; BASTOS, L. P. Fish, Cubatão River basin, Atlantic Rainforest stream, Paraná, Brazil. **Check List**, v. 5, n. 1, p. 008–018, 1 jan. 2009.
- ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, p. 27–53, 2 nov. 2020. DOI. 10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032
- ALEXANDROU, M. *et al.* Competition and phylogeny determine community structure in Müllerian co-mimics. **Nature**, v. 469, n. 7328, p. 84-88, 2011.
- ANTONELLI, A. *et al.* Conceptual and empirical advances in Neotropical biodiversity research. **peerj.com**, 2018.
- ARANHA, J. M. R.; TAKEUTI, D. F.; YOSHIMURA, T. M. Habitat use and food partitioning of the fishes in a coastal stream of Atlantic Forest, Brazil. **Revista de Biología Tropical**, v. 46, n. 4, p. 951–959, 1998.
- ARGOLO, L. A. *et al.* Unraveling the systematics and evolution of the ‘*Geophagus brasiliensis*’ (Cichliformes: Cichlidae) species complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 150, p. 106855, 2020.
- BRITTO, M. R. Phylogeny of the subfamily Corydoradinae Hoedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 153, n. 1, p. 119–154, 2003.
- BRITTO, M. R.; FUKAKUSA, C. K.; MALABARBA, L. R. New species of *Scleromystax* Günther, 1864 (Siluriformes: Callichthyidae) - extending the meridional distribution of genera endemic to the Atlantic Forest. **Neotropical Ichthyology**, v. 14, n. 3, p. 150158, 30 set. 2016.
- BRITTO, M. R.; REIS, R. E. A new *Scleromystax* species (Siluriformes: Callichthyidae) from coastal rivers of southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 4, p. 481–488, dez. 2005.
- CASTRO, R. M. C.; POLAZ, C. N. M. Small-sized fish: the largest and most threatened portion of the megadiverse neotropical freshwater fish fauna. **Biota Neotropica**, v. 20, n. 1, 13 dez. 2019.
- COSTA-SILVA, G. J. *et al.* Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex Neotropical hyperdiverse group. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0135075, 2015.
- CUNICO, A. M. *et al.* Fish, Maringá urban streams, Pirapó River drainage, upper Paraná River basin, Paraná state, Brazil. **Check List**, v. 5, n. 2, p. 273, 2009.

- DE BRITO, V.; BUCKUP, P. A. The fish fauna of the upper Pirai drainage, a transposed mountain river system in southeastern, Brazil. **Check List**, v. 15, n. 1, p. 235, 2019.
- DE PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes: Historical overview and synthesis of hypothesis. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, p. 279–330, 1998.
- DOMINGOS, F. F. T. *et al.* Assessment of fish assemblage in an urban system, Itapecerica River, upper São Francisco River basin, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil. **Check List**, v. 9, n. 3, p. 482–486, 2013.
- EIGENMANN, C. H.; SMITH-EIGENMANN, R. Preliminary notes on South American nematognathi. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v.2, p.28-56, 1889.
- ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Species by family/subfamily. **Catalog of fishes**, 2023.
- ESTEVEZ, K. E.; LOBÓN-CERVIÁ, J. Composition and trophic structure of a fish community of a clear water Atlantic rainforest stream in southeastern Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 62, p. 429–440, 2001.
- GARAVELLO, J. C. *et al.* Integrative taxonomy reveals a new species of Neotropical headstanding fish in genus *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 19, 2021.
- GEE, J. H.; GRAHAM, J. B. Respiratory and hydrostatic functions of the intestine of the catfishes *Hoplosternum thoracatum* and *Brochis splendens* (Callichthyidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 74, n. 1, p. 1–16, 1 jun. 1978.
- GONÇALVES, C. DA S. *et al.* Identification key for fishes from coastal streams of the Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 17, 2017.
- GONÇALVES, C. DA S.; BRAGA, F. M. DE S. Changes in ichthyofauna composition along a gradient from clearwaters to blackwaters in coastal streams of Atlantic forest (southeastern Brazil) in relation to environmental variables. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 675–684, 2012.
- GONÇALVES, C. DA S.; CESTARI, C. Uso de riacho costeiro da mata atlântica pelo limpa-fundo *Scleromystax barbatus* (Quoy & Gaimard, 1824). **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, n. 3, p. 115–120, 2013.
- GOSLINE, W. A. A revision of the Neotropical catfishes of the family Callichthyidae. **Stan. Lchth. Bull.**, v. 2, p. 1–29, 1940.
- GÜNTHER, A. Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiatidae in the collection of the British Museum. **Catalogue of the fishes in the British Museum**, v. 5, p. 1-22, 1864.

- HARRISON, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 4, n. 1, p. 6–11, 1989.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, 2003.
- IBAÑEZ, A. *et al.* Unraveling the *Mugil curema* complex of American coasts integrating genetic variations and otolith shapes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, p. 107914, 2022.
- MALABARBA, L. R.; MALABARBA, M. C. Phylogeny and classification of neotropical fish. **Elsevier Inc.**, 2019.
- MARBURGER, S. *et al.* Whole genome duplication and transposable element proliferation drive genome expansion in Corydoradinae catfishes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1872, 14 fev. 2018.
- MENEZES, N. A. *et al.* **Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais.** São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2007.
- OYAKAWA, O. T. *et al.* **Peixes de riachos da Mata Atlântica:: nas unidades de conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo.** São Paulo: Neotropica, 2006.
- PADIAL, J. M. *et al.* The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2010.
- PADIAL, J. M.; DE LA RIVA, I. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 155, n. 1, p. 97–122, 2009.
- PAPAKOSTAS, S. *et al.* Integrative taxonomy recognizes evolutionary units despite widespread mitonuclear discordance: evidence from a rotifer cryptic species complex. **Systematic Biology**, v. 65, n. 3, p. 508–524, 2016.
- PINHEIRO, P. C.; DALCIN, R. H.; BATISTA, T. T. A ictiofauna de áreas com interesse para a proteção ambiental de Joinville, Santa Catarina, Brasil. **Acta Biológica Catarinense**, v. 4, n. 3, 21 dez. 2017.
- POMPEU, PAULO S.; ALVES, Carlos Bernardo M.; CALLISTO, MARCOS. The effects of urbanization on biodiversity and water quality in the Rio das Velhas basin, Brazil. In: **American Fisheries Society Symposium**. p. 11-22, 2005
- PUGEDO, M. L. *et al.* Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin. **Genetica**, v. 144, n. 3, p. 341–349, 2016.

REIS, R. E. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 124, n. 2, p. 105–168, 1998.

REIS, R. E. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12–47, 1 jul. 2016.

ROCHA-REIS, D. A. *et al.* The complete mitochondrial genome of two armored catfish populations of the genus *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 579965, 2020.

SANTOS DE LUCENA, C. A. *et al.* Conjectures and refutations: Species diversity and phylogeny of *Australoheros* from coastal rivers of southern South America (Teleostei: Cichlidae). **Plos one**, v. 17, n. 12, p. e0261027, 2022.

SOUTO-SANTOS, I. C. A.; JENNINGS, W. B.; BUCKUP, P. A. Testing palaeodrainage hypotheses in south-eastern Brazil: phylogeography of the sinistral livebearer fish of the genus *Phalloceros* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 2022.

SOUZA, C. S. *et al.* Genetic and morphological analyses demonstrate that *Schizolecis guntheri* (Siluriformes: Loricariidae) is likely to be a species complex. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 69, 2018.

TAN, D. S. H. *et al.* From ‘cryptic species’ to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae: Diptera). **Zoologica Scripta**, v. 39, n. 1, p. 51–61, 2010.

TENCATT, L. F. C. *et al.* Taxonomy of the armored catfish genus *Aspidoras* (Siluriformes: Callichthyidae) revisited, with the description of a new species. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, n. 3, 14 out. 2022.

THOMAZ, A. T. *et al.* Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: Study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, v. 42, n. 12, p. 2389–2401, 2015.

THOMAZ, A. T.; MALABARBA, L. R.; KNOWLES, L. L. Genomic signatures of paleodrainages in a freshwater fish along the southeastern coast of Brazil: genetic structure reflects past riverine properties. **Heredity**, v. 119, n. 4, p. 287–294, 2017.

WIENS, J. J.; KUCZYNSKI, C. A.; STEPHENS, P. R. Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: implications for speciation and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, n. 2, p. 445–461, 2010.

XIAO, J.H. *et al.* Molecular approaches to identify cryptic species and polymorphic species within a complex community of fig wasps. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15067, 2010.

ZHANG, Huajun; GAO, Li-An; ZHANG, Wenlei. First complete mitochondrial genome of the *Corydoras pygmaeus* (Actinopteri: Callichthyidae) and its phylogenetic implications. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 7, n. 9, p. 1688-1690, 2022.

CAPÍTULO 1 COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF FOUR *Scleromystax barbatus* (SILURIFORMES: CALLICHTHYIDAE) POPULATIONS

(Capítulo submetido e aceito a Neotropical Ichthyology)

Roger Henrique Dalcin¹, Luz Elena De La Ossa-Guerra², Roberto Ferreira Artoni³ and Vinícius Abilhoa⁴

¹Universidade Federal do Paraná, Campus Curitiba, Rua XV de Novembro, nº 1299, CEP 80060-000 Curitiba, PR, Brazil. roger_dalcin@hotmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-7896-7404> (corresponding author)

²Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luis, CEP 13565-905 São Carlos, SP, Brazil. 03ledg@gmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-7407-9709>

³Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84030-900 Ponta Grossa, PR, Brazil. rfartoni@gmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2528-9846>

⁴Museu de História Natural Capão da Imbuia, MAPCF/PMC, Rua Prof. Nivaldo Braga, nº 1369, CEP 82810-080, Curitiba, PR, Brazil. vinicius.abilhoa@gmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-9463-0200>

RESUMO

O mitogenoma completo de quatro populações de *Scleromystax barbatus* coletadas ao longo da área de distribuição conhecida foi reconstruído, compreendendo o primeiro estudo com este gênero e o segundo com espécimes de Corydoradinae amostrados em seu ambiente natural e depositados em coleções permanentes. O mitogenoma de *S. barbatus* é uma molécula circular de 16.694 pares de bases (pb) compreendendo 37 genes, dos quais 22 são tRNA, dois são rRNA, 13 são genes codificadores de proteínas e um, uma região de controle (D-loop). Uma sequência de inserção de 18 nucleotídeos foi encontrada entre a subunidade 6 da ATPase e os genes COIII. A maioria dos genes é codificada na fita pesada, enquanto o ND6 e oito tRNAs são encontrados na fita leve. Análises filogenéticas usando outros mitogenomas de Callichthyidae disponíveis confirmaram a monofilia de Corydoradinae e indicam que as populações de *S. barbatus* formam um ramo separado e irmão de *Corydoras*.

Palavras-chaves: análises filogenéticas; Callichthyidae; DNA mitocondrial; identificação molecular; marcadores.

ABSTRACT

The complete mitogenome of four *Scleromystax barbatus* populations distributed along the species know range was reconstructed, comprising the first study with this genus and the second with Corydoradinae specimens sampled from their natural environment and deposited in permanent collections. The mitogenome of *S. barbatus* is a circular molecule of 16694 base pairs (bp) comprising 37 genes, 22 of which are tRNA, two are rRNA, 13 are protein-coding genes and one, a control region (D-loop). An 18-nucleotide insertion sequence was found between the ATPase subunit 6 and COIII genes. Most genes are encoded on the heavy strand, while the ND6 and eight tRNAs are found on the light strand. Phylogenetic analyses using other available Callichthyidae mitogenomes confirmed the monophyly of Corydoradinae and indicate that *S. barbatus* populations form a separate and sister branch of *Corydoras*.

Keywords: Callichthyidae; markers; mitochondrial DNA; molecular identification; phylogenetic analysis.

1 INTRODUCTION

Corydoradinae is a subfamily of Callichthyidae, one of the largest monophyletic family of catfish widely distributed in the Neotropical region (REIS, 1998, 2003). Currently, this subfamily is composed of three genera and 207 valid species (BRITTO, 2003; ESCHMEYER; FONG, 2023; TENCATT *et al.*, 2022a). Nevertheless, despite its richness, the main studies concerning Corydoradinae are focused on the description of new species, especially in *Corydoras* Lacepède 1803 (Rocha *et al.*, 2022; Tencatt *et al.*, 2022b). Some attempts, however, have been performed to resolve phylogenetic relationships between groups (Alexandrou *et al.*, 2011; Britto, 2003; Marburger *et al.*, 2018; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004).

Among Corydoradinae members, *Scleromystax* Günther 1864 exhibits the lowest diversity and is restricted to Atlantic Rainforest coastal rivers (BRITTO, 2003; BRITTO; FUKAKUSA; MALABARBA, 2016). This genus was revalidated by Britto (2003), including three species previously belonging to *Corydoras*. Subsequently, two *Scleromystax* species were described (BRITTO; FUKAKUSA; MALABARBA, 2016; BRITTO; REIS, 2005), and one species previously included in *Aspidoras* Ihering 1907 has been recently reclassified to *Scleromystax* (TENCATT *et al.*, 2022a), bringing the total number of known species to six for the genus.

Scleromystax barbatus Günther 1864 is the type species of the genus and exhibits the widest distribution among *Scleromystax* representatives, extending to the coastal rivers of the Atlantic Rainforest, from the Paraíba do Sul River, in the state of Rio de Janeiro, to Itapocu River, in the state of Santa Catarina (MENEZES *et al.*, 2007; REIS, 2003). The species presents an accentuated sexual dimorphism. Adult males present odontoids in the lateral region of the head, spines on the dorsal fin, and elongated pectoral fins (BRITTO, 2003). It also inhabits shallow environments with weak to moderate currents and substrates consisting of clay or sandy bottoms, moving in small shoals or alone in clear stream and river waters. Its diet is omnivorous, and its food is obtained by exploring the bottom in search of small invertebrates, plant fragments and algae (ARANHA; TAKEUTI; YOSHIMURA, 1998; GONÇALVES; BRAGA, 2013). Molecular genetic variation within *S. barbatus* populations of southern Brazil indicate that this species is an interesting model for phylogeographic studies (TSCHÁ *et al.*, 2017).

The rapid evolution of mitochondrial DNA and its small size make this an important tool in evolutionary genetics, molecular ecology, species identification and conservation biology (HARRISON, 1989; MA *et al.*, 2012; ZHANG; GAO; ZHANG, 2022). Complete mitochondrial genome sequences are becoming an increasingly important apparatus in the study of fish phylogenies due to advances in sequencing techniques and biological data analyses (BETANCUR-R *et al.*, 2017; ROCHA-REIS *et al.*, 2020). With regard to Corydoradinae, however, studies are scarce and concentrate only on *Corydoras* (LIU *et al.*, 2019b; MOREIRA *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2022).

In this context, the present study aims to sequence, assemble and annotate the complete mitogenome of four *S. barbatus* populations, providing an important addition to future phylogenetic Corydoradinae studies as the first mitogenome from a *Scleromystax* member, which is the type species of the genus.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 SPECIMEN SAMPLINGS.

Individuals from four *S. barbatus* populations were collected by electrofishing and trawling along their known distribution between 2019 and 2021 (TABLE 1). In the field, individuals were anesthetized and sacrificed. Tissue samples (pieces of muscle and pectoral fin) were removed from each individual and preserved in 100% alcohol. The specimens were then fixed in 4% formalin and transferred to 70% alcohol in the laboratory. All specimens were deposited at the Natural History Museum of Capão da Imbuia Ichthyological Collection. Experiments were approved by the Ethical Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEU/BIO-UFPR) process 23075,066050/2022-03 number 1489.

TABLE 1 – Code used in the analysis of *S. barbatus* populations, locality, river, coordinates where the collections were carried out and voucher.

Code	Locality	River	UTM	Voucher
AE	Itariri-SP	Aerado	282136/ 7311146	MHNCI 12734
AR	Angra dos Reis - RJ	Ariró	567045/ 7467176	MHNCI 12735
PE	Barra do Sul-SC	Pernambuco	731229/ 7079181	MHNCI 12736
PS	Teresópolis-RJ	Canoas	718825/7520595	MHNCI 12737

Fonte: O autor (2023).

2.2 SEQUENCING AND MITOGENOME ASSEMBLY

Genomic DNA was extracted using the saline method and the purity was checked on a 1% agarose gel and on NanoVue. The extracted DNA was sequenced using the DNBSseq sequencing platform (BGI Genomics), which generated 150pb paired-end sequences. The quality of the clean data was verified using FASTQC. We then used the GetOrganelle v1.7.6.1 (JIN *et al.*, 2020) for the *de novo* assembly of the mitogenome, using *Corydoras* Genbank sequences as a reference (TABLE 2). We checked genome circularity using the Bandagev.0.9.0 software (WICK *et al.*, 2015). Annotation was performed using the MitoAnnotator tool

(<http://mitofish.aori.utokyo.ac.jp/annotation/input.html>), included in the Mitofish Database v3.73 (IWASAKI *et al.*, 2013).

2.3 PHYLOGENETIC ANALYSIS

Phylogenetic analyses were performed using 13 PCGs (protein-coding genes), including four mitogenomes from *S. barbatus* and some related Callichthyidae species obtained at Mitofish and Genbank (TABLE 2). The species *Hoplosternum littorale* was used as outgroup. All species were aligned using the MAFFT v7.017 software (KATOHI *et al.*, 2002). The best-fit model (GTR + G) was selected for concatenate sequences using jModeltest 2.1.10 (DARRIBA *et al.*, 2012) under the corrected Akaike information criterion. We ran 200000 MCMC with a 25% burn-in. The tree was constructed using Mr. Bayes v3.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003).

TABLE 2 – Species used from genbank and the present study and their respective accession and source numbers.

Specie	Accession number	Author
<i>Scleromystax barbatus</i> (AE)	OQ507208	This study
<i>Scleromystax barbatus</i> (AR)	OQ507209	This study
<i>Scleromystax barbatus</i> (PE)	OQ507210	This study
<i>Scleromystax barbatus</i> (PS)	OQ507211	This study
<i>Corydoras aeneus</i> (Gill 1858)	MZ571336	Sun <i>et al.</i> (2022)
<i>Corydoras arcuatus</i> Elwin 1938	NC_049096	Liu <i>et al.</i> (2019c)
<i>Corydoras duplicareus</i> Sands 1995	NC_049095	Liu; Xu; Xiao, (2019)
<i>Corydoras nattereri</i> Steindachner 1876	KT239009	Moreira <i>et al.</i> (2016)
<i>Corydoras paleatus</i> (Jenyns 1842)	MZ571337	Sun <i>et al.</i> (2022)
<i>Corydoras panda</i> Nijssen & Isbrücker 1971	NC_049097	Liu <i>et al.</i> (2019a)
<i>Corydoras rabauti</i> LaMonte 1941	NC_004698	Saitoh <i>et al.</i> (2003)
<i>Corydoras sterbai</i> Knaack 1962	NC_048967	Liu <i>et al.</i> (2019b)
<i>Corydoras trilineatus</i> Cope 1872	NC_049098	Chen <i>et al.</i> (2020)
<i>Hoplosternum littorale</i> (Hancock 1828)	KX087170	Parente <i>et al.</i> (2018)

Fonte: O autor (2023).

3 RESULTS

The mitochondrial genome of the four *S. barbatus* populations is a circular molecule 16,694 base pairs (bp) in length. It consists of 37 genes, 22 of which are tRNA, two are rRNA, 13 are protein-coding genes, and one is a control region (D-loop). An 18-nucleotide insertion sequence was found between the ATPase subunit 6 and COIII genes. Most of the genes are encoded on the heavy strand, while ND6 and eight tRNAs are found on the light strand. All protein-coding genes use ATG start codons, except for COI, which uses GTG. Seven protein-coding genes end with the complete stop codon, five of which end with TAA (ATP8, ATP6, ND4L, ND5 and ND6), one with TAG (ND1) and one with AGG (COI), while the remaining protein-coding genes are terminated with incomplete stop codons (ND2, COII, COIII., ND3, ND4, Cyt b). FIGURE 1 and TABLE 4 depict the mitogenome annotation of the AR population, which is the closest to the *S. barbatus* type locality (NIJSSEN; ISBRÜCKER, 1980). A summary of the other populations is reported in ANEXO 1 and 2. The nucleotide composition is summarized in TABLE 3.

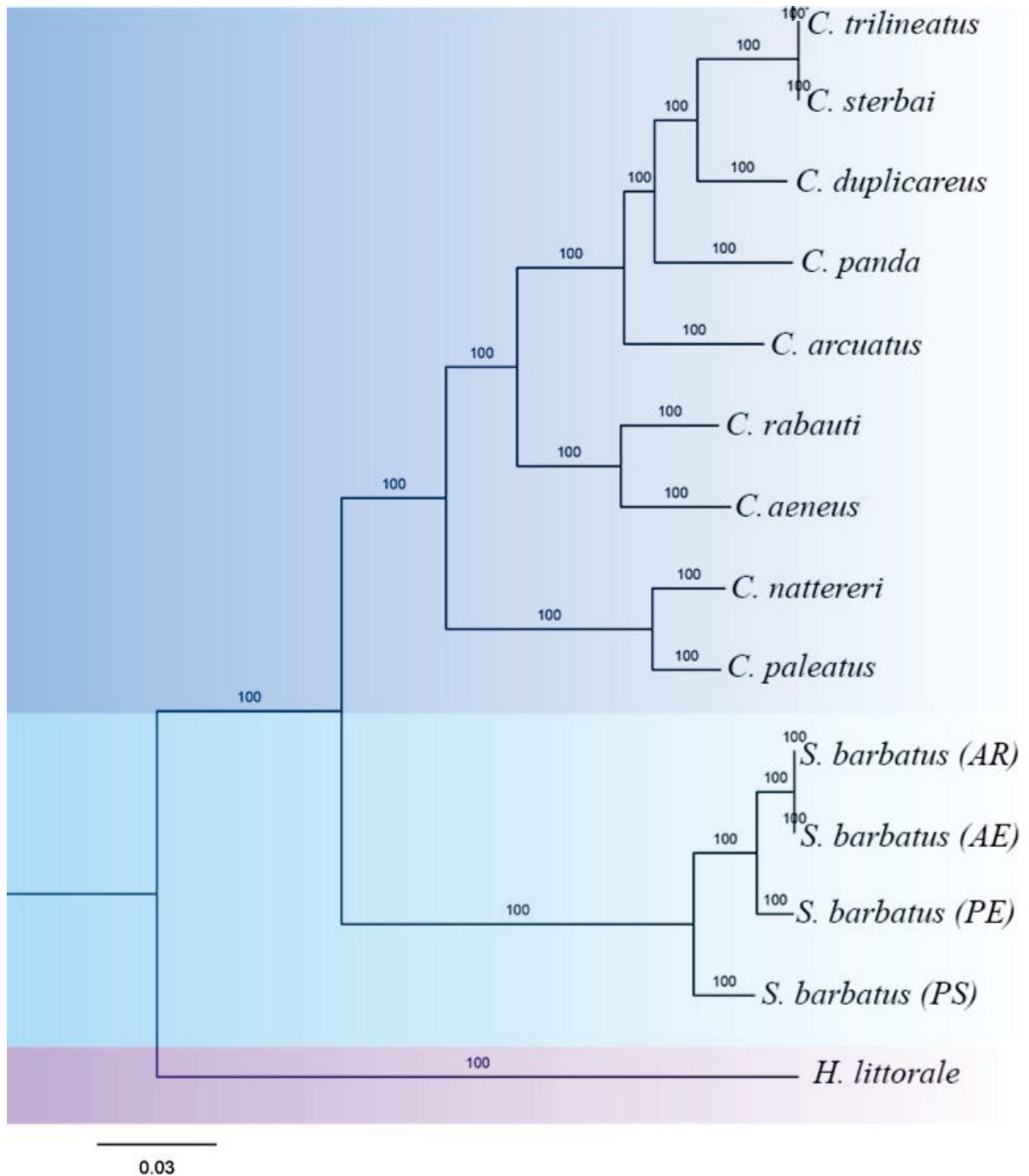
TABLE 4 – Annotation of the complete mitochondrial genome of a *Scleromystax barbatus* individual belonging to the AR population.

Gene	Strand	Position		Length(bp)	Codon	
		Start	End		Start	Stop
tRNA-Phe	H	1	68	68		
12S rRNA	H	69	1016	948		
tRNA-Val	H	1017	1088	72		
16S rRNA	H	1089	2756	1668		
tRNA-Leu ^a	H	2757	2831	75		
ND1	H	2832	3803	972	ATG	TAG
tRNA-Ile	H	3812	3883	72		
tRNA-Gln	L	3882	3952	71		
tRNA-Met	H	3952	4021	70		
ND2	H	4022	5066	1045	ATG	T--
tRNA-Trp	H	5067	5137	71		
tRNA-Ala	L	5139	5207	69		
tRNA-Asn	L	5209	5281	73		
tRNA-Cys	L	5312	5378	67		
tRNA-Tyr	L	5378	5447	70		
COI	H	5449	7008	1560	GTG	AGG
tRNA-Ser ^b	L	6996	7066	71		
tRNA-Asp	H	7071	7140	70		
COII ^c	H	7145	7835	691	ATG	T--
tRNA-Lys	H	7836	7909	74		
ATPase 8	H	7911	8078	168	ATG	TAA
ATPase 6 ^c	H	8069	8752	684	ATG	TAA
COIII ^c	H	8771	9554	784	ATG	T--
tRNA-Gly	H	9555	9626	72		
ND3 ^c	H	9627	9975	349	ATG	T--
tRNA-Arg	H	9976	10045	70		
ND4L	H	10046	10342	297	ATG	TAA
ND4 ^c	H	10336	11716	1381	ATG	T--
tRNA-His	H	11717	11786	70		
tRNA-Ser ^d	H	11787	11853	67		
tRNA-Leu ^e	H	11855	11927	73		
ND5	H	11928	13754	1827	ATG	TAA
ND6	L	13751	14266	516	ATG	TAA
tRNA-Glu	L	14267	14335	69		
Cyt b	H	14338	15475	1138	ATG	T--
tRNA-Thr	H	15476	15547	72		
tRNA-Pro	L	15546	15615	70		
D-loop	H	15616	16694	1079		

Fonte: O autor (2023).

Phylogenetic analyses using the mitochondrial genome of Callichthyidae species indicated that the Corydoradinae subfamily formed a well-separated branch (FIGURE 2). In addition, the validity and taxonomic identification of *S. barbatus* was also strengthened.

FIGURE 2 – Phylogenetic analysis of 13 Corydoradinae and *Hoplosternum littorale* (Callichthyinae member) species as the outgroup based on the nucleotide sequences of 13 pcgs from the mitochondrial genome. bootstrap values are shown next to nodes and the scale bar shows 0.03 changes.



Fonte: O autor (2023).

4 DISCUSSION

Phylogenetic analyses confirm the monophyly of Corydoradinae among the members whose mitogenome information is available. The *S. barbatus* populations were placed as a sister group of the clade formed by the species of *Corydoras* utilized in our analyses, however, sequencing of the mitogenomes of *Aspidoras* species is necessary for a better understanding of the phylogenetic relationships among the valid genera of Corydoradinae, because morphological (BRITTO, 2003) and molecular (ALEXANDROU *et al.*, 2011; MARBURGER *et al.*, 2018; SHIMABUKURO-DIAS *et al.*, 2004) phylogenies usually recover *Scleromystax* closer to *Aspidoras*.

Our phylogeny recovered the PS population (Paraíba do Sul basin) as a sister group of the other populations analyzed, indicating that the name *S. barbatus* may represent a species complex. Indeed, other works with phylogenetic relationships involving individuals of *S. barbatus* also found similar results, with some studies using the name *Scleromystax kronei* (which is currently synonym of *S. barbatus*) for populations from Vale do Ribeira and nearby coastal drainages (ALEXANDROU *et al.*, 2011; MARBURGER *et al.*, 2018). However, further studies on *S. barbatus* are needed to make such inferences.

The order and arrangement of the mitochondrial genomes of the evaluated *S. barbatus* populations were identical to each other and similar to other Siluriformes members (MOREIRA *et al.*, 2016; ROCHA-REIS *et al.*, 2020; SAITOH *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2021, 2022) with the ND6 gene and eight tRNAs found on the light strand. The size of the mitogenomes ranged from 16,614 to 16,694 bp, and the nucleotide composition was 41.6% G+C for all populations, very close to the percentages found in other Corydoradinae members (CHEN *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2019a, 2019b; MOREIRA, *et al.* 2016; XU, *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2022).

The four *S. barbatus* populations presented an 18-nucleotide sequence insertion between the ATPase subunit-6 and COIII genes, also found in other Callichthyidae members, with similar values noted for Corydoradinae members (MOREIRA *et al.*, 2016; SAITOH *et al.*, 2003) and higher values for Callichthyinae members (PARENTE *et al.*, 2018), suggesting that this insertion may be a synapomorphy among Callichthyidae subfamilies.

This is the first reported on the mitogenome of *S. barbatus* populations and the second study on Corydoradinae species using individuals sampled from their natural environment and deposited in permanent collections. In this context, this study fills an existing gap for the Neotropical region, furthering information on a genus restricted to coastal Atlantic Rainforest streams, and may be useful for future studies on Callichthyidae population genetics and evolution.

REFERENCES

- ALEXANDROU, Markos A. *et al.* Competition and phylogeny determine community structure in Müllerian co-mimics. **Nature**, v. 469, n. 7328, p. 84-88, 2011.
- ARANHA, J. M. R.; TAKEUTI, D. F.; YOSHIMURA, T. M. Habitat use and food partitioning of the fishes in a coastal stream of Atlantic Forest, Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 46, n. 4, p. 951–959, 1998.
- BETANCUR-R, R. *et al.* Phylogenetic classification of bony fishes. **BMC evolutionary biology**, v. 17, n. 1, p. 1–40, 2017.
- BRITTO, M. R. Phylogeny of the subfamily Corydoradinae Hoedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 153, n. 1, p. 119–154, 2003.
- BRITTO, M. R.; FUKAKUSA, C. K.; MALABARBA, L. R. New species of *Scleromystax* Günther, 1864 (Siluriformes: Callichthyidae) - extending the meridional distribution of genera endemic to the Atlantic Forest. **Neotropical Ichthyology**, v. 14, n. 3, p. 150-158, 30 set. 2016.
- BRITTO, M. R.; REIS, R. E. A new *Scleromystax* species (Siluriformes: Callichthyidae) from coastal rivers of southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 4, p. 481–488, dez. 2005.
- CHEN, L. *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of *Corydoras trilineatus* mitochondrial genome. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 5, n. 3, p. 3017-3018, 2020.
- DA ROCHA, R. H. *et al.* Integrated analysis reveals a new species of *Corydoras* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Callichthyidae) in the lower Iguassu River, Brazil. **Organisms Diversity and Evolution**, v. 22, n. 2, p. 457–474, 1 jun. 2022.
- ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Species by family/subfamily. **Catalog of fishes**, 2023.
- GONÇALVES, C. DA S.; BRAGA, F. M. DE S. Checklist of freshwater ichthyofauna from coastal streams of Juréia-Itatins reserve, southeastern Brazil. **Check List**, v. 9, n. 2, p. 175–185, 1 abr. 2013.
- HARRISON, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 4, n. 1, p. 6–11, 1989.
- IWASAKI, W. *et al.* MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 11, p. 2531–2540, nov. 2013.
- JIN, J. J. *et al.* GetOrganelle: A fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes. **Genome Biology**, v. 21, n. 1, p. 1–31, set. 2020.

- KATOH, K. *et al.* MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 2002.
- LIU, Qiaolin *et al.* Complete mitochondrail genome of *Corydoras panda* (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae, Corydoradinae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 2878-2879, 2019a.
- LIU, Qiaolin *et al.* Next-generation sequencing yields the complete mitochondrial genome of *Corydoras sterbai* (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae, Corydoradinae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 2880-2881, 2019b.
- LIU, Q.; XU, B.; XIAO, T. Complete mitochondrial genome of *Corydoras duplicareus* (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 1, p. 1832-1833, 2019.
- LIU, Yi *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of *Corydoras arcuatus* mitochondrial genome. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 2876-2877, 2019c.
- MA, C. *et al.* Mitochondrial genomes reveal the global phylogeography and dispersal routes of the migratory locust. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 17, p. 4344–4358, 2012.
- MARBURGER, S. *et al.* Whole genome duplication and transposable element proliferation drive genome expansion in Corydoradinae catfishes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1872, 14 fev. 2018.
- MENEZES, N. A. *et al.* **Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2007.
- MOREIRA, D. A. *et al.* The complete mitochondrial genome of *Corydoras nattereri* (Callichthyidae: Corydoradinae). **Neotropical Ichthyology**, v. 14, n. 1, 2016.
- PARENTE, T. E. *et al.* Remarkable genetic homogeneity supports a single widespread species of *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae) in South America. **Conservation Genetics Resources**, v. 10, n. 3, p. 563–569, 1 set. 2018.
- REIS, R. E. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 124, n. 2, p. 105–168, 1998.
- REIS, R. E. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.
- ROCHA-REIS, D. A. *et al.* The complete mitochondrial genome of two armored catfish populations of the genus *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 579965, 2020.
- RONQUIST, F. Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. **Syst Biol**, v. 46, n. 1, p. 195–203, 1997.

- SAITOH, K. *et al.* Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. **Journal of Molecular Evolution**, v. 56, n. 4, p. 464–472, 2003.
- SHIMABUKURO-DIAS, C. K. *et al.* Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 152–163, 1 jul. 2004.
- SUN, C. H. *et al.* Comparative analysis of the mitogenomes of two *Corydoras* (Siluriformes, Loricarioidei) with nine known *Corydoras*, and a phylogenetic analysis of Loricarioidei. **ZooKeys**, v. 1083, n. 1083, p. 89, 2022.
- TENCATT, L. F. C. *et al.* Taxonomy of the armored catfish genus *Aspidoras* (Siluriformes: Callichthyidae) revisited, with the description of a new species. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, n. 3, 14 out. 2022a.
- TENCATT, L. F. C. *et al.* Science and hobby joining forces for the discovery of three new *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from the rio Tapajós basin, Brazil, with comments on *Corydoras* sp. CW111. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, n. 3, p. 2022, 14 out. 2022b.
- TSCHÁ, M. K. *et al.* Past connection and isolation of catchments: The sea-level changes affect the distribution and genetic variability of coastal freshwater fishes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 190, p. 31–39, 2017.
- WICK, R. R. *et al.* Bandage: Interactive visualization of de novo genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 31, n. 20, p. 3350–3352, 2015.
- XU, Baohong *et al.* Complete mitochondrial genome of *Brochis multiradiatus*. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 5, n. 1, p. 646–647, 2020.
- ZHANG, H.; GAO, L.A.; ZHANG, W. First complete mitochondrial genome of the *Corydoras pygmaeus* (Actinopteri: Callichthyidae) and its phylogenetic implications. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 7, n. 9, p. 1688–1690, 2022.
- ZHANG, K. *et al.* Characterization of the complete mitochondrial genome of *Macrotocinclus affinis* (Siluriformes; Loricariidae) and phylogenetic studies of Siluriformes. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 1, p. 677–689, 2021.
- ZHANG, R. *et al.* Complete mitochondrial genomes of two catfishes (Siluriformes, Bagridae) and their phylogenetic implications. **ZooKeys**, v. 1115, p. 103–116, 2022.

CAPÍTULO 2 TAXONOMIA INTEGRATIVA DE DIFERENTES POPULAÇÕES De *SCLEROMYSTAX BARBATUS* (Siluriformes: Callichthyidae)

RESUMO

Scleromystax barbatus é um cascudo da família Callichthyidae que ocorre naturalmente em riachos costeiros da Mata Atlântica, com distribuição entre o Rio de Janeiro e Santa Catarina. Estudos de história evolutiva e biogeográfica da ictiofauna Neotropical mostraram que algumas espécies de peixes encontradas em bacias hidrográficas isoladas da Mata Atlântica, que apresentam uma ampla distribuição, podem representar um conjunto de espécies. Por ser uma espécie com ampla distribuição ao longo da Mata Atlântica e restrita a bacias hidrográficas isoladas, *S. barbatus* pode ser um modelo interessante para estudos filogeográficos, ajudando a entender o processo evolutivo da família Callichthyidae e de outros táxons da Mata Atlântica. Nossa hipótese é de que o grau de isolamento e a complexidade histórica e geomorfológica das bacias hidrográficas da Mata Atlântica acarretaram alterações nos padrões evolutivos e de diversificação das populações de *S. barbatus* ao longo de sua área de distribuição natural, o que provavelmente promoveu a divergência em caracteres ecológicos, morfológicos e genéticos. Foram coletados 165 indivíduos de *S. barbatus* pertencentes as 10 populações ao longo de sua distribuição natural. Amostras de tecido muscular foram retiradas e o DNA foi extraído pelo método salino, análises morfométricas foram feitas a partir de fotos do lado esquerdo do corpo e analisadas de forma separada para machos e fêmeas. Sequências parciais dos genes mitocondriais Cytb e ND4 e o nuclear RAG1 foram utilizadas para análises de variância molecular, estatísticas populacionais par a par *Fst*, redes de haplótipos, árvores bayesianas e três métodos automatizados de particionamento de linhagem. Análises de morfometria geométrica foram realizadas, baseadas em 15 marcos anatômicos homólogos a todos os indivíduos e avaliados através das Análises de Componentes Principais e de Variáveis Canônicas e de disparidade morfológica. Para testar a correlação entre as análises filogenéticas e morfológicas, o sinal filogenético foi estimado com uma versão modificada da estatística *K*. Resultados das análises moleculares e morfológicas indicam que as populações de *S. barbatus* apresentam uma alta divergência molecular e uma baixa diferenciação morfológica, entretanto quatro linhagens evolutivas foram identificadas em ambas as análises.

Palavras-chave: Corydoradinae; delimitação de espécies; paleodrenagens; peixes de água doce; taxonomia integrativa.

ABSTRACT

Scleromystax barbatus is a coridoras of the Callichthyidae family that occurs naturally in coastal streams of the Atlantic Forest, with distribution between Rio de Janeiro and Santa Catarina. Studies on the evolutionary history and biogeography of the Neotropical ichthyofauna have shown that some fish species found in isolated watersheds of the Atlantic Forest, which have a wide distribution, may represent a set of species. As a species with a wide distribution throughout the Atlantic Forest and restricted to isolated watersheds, *S. barbatus* can be an interesting model for phylogeographic studies, helping to understand the evolutionary process of the Callichthyidae family and other taxa of the Atlantic Forest. Our hypothesis is that the degree of isolation and the historical and geomorphological complexity of the Atlantic Forest watersheds led to changes in the evolutionary patterns and diversification of *S. barbatus* populations throughout its natural distribution area, which probably promoted a divergence in ecological, morphological and genetic characters. We found 165 individuals of *S. barbatus* belonging to 10 populations throughout its natural distribution. Muscular tissue samples were taken and DNA was extracted by the saline method, morphometric analyzes were made from photos of the left side of the body and evidence separately for males and females. Partial sequences of the mitochondrial genes Cytb and ND4 and the nuclear RAG1 were used for analysis of molecular variance, population statistics by F_{st} pair, haplotype networks, Bayesian trees and three automated lineage partitioning methods. Morphometric analyzes were performed annually, based on 15 anatomical landmarks homologous to all individuals and evaluated through Principal Component and Canonical Variable Analyzes and morphological disparity. To test the clarity between the phylogenetic and morphological analyses, the phylogenetic signal was estimated with a modified version of the K statistic. The results of the molecular and morphological analyzes indicate that populations of *S. barbatus* present a high molecular divergence and a low morphological differentiation, however, four evolutionary lineages were identified in both analyses.

Keywords: Corydoradinae; freshwater fishes; integrative taxonomy; paleodrainages; species delimitation.

1 INTRODUÇÃO

A identificação e a delimitação de espécies ou de unidades evolutivas são informações básicas para os estudos relacionados com a biogeografia, a ecologia e a conservação da biodiversidade (SITES JR; MARSHALL, 2004), com influência direta sobre a comunicação, o manejo e questões normativas e legais relacionadas à conservação (AGAPOW *et al.*, 2004; ZACHOS, 2018). Entretanto, dependendo da abordagem utilizada, os arranjos taxonômicos podem apresentar características mais aglutinadoras ou resultar em um grande número de linhagens evolutivas, tornando a discriminação de espécies um problema para muitos grupos (PADIAL; DE LA RIVA, 2009; PAPAKOSTAS *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2010), particularmente para os peixes da região neotropical, que apresentam grande riqueza e alto número de espécies crípticas (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020; MASTROCHIRICO FILHO *et al.*, 2018).

Muitos métodos têm sido propostos para a identificação de espécies e diferentes linhagens evolutivas (PADIAL *et al.*, 2010) e, com os avanços das técnicas de sequenciamento e análises de dados moleculares, as ferramentas genéticas são cada vez mais utilizadas para as delimitações de espécies (BLEIDORN, 2017). Os avanços mais significativos no uso de ferramentas moleculares para delimitação de espécies foram impulsionados pela tentativa de padronização da identificação de espécies por meio do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI) (HEBERT *et al.*, 2003; HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003), metodologia conhecida como “*DNA Barcode*”, amplamente utilizada na identificação de espécies (HENRIQUES *et al.*, 2015; LEAVITT *et al.*, 2013; PANG *et al.*, 2010; WAUGH, 2007).

O DNA mitocondrial (DNAmit) apresenta particularidades que tornaram interessante o seu uso em estudos populacionais, como, por exemplo, o número haploide e a herança materna, que não permitem ou tornam muito raro os eventos de recombinação gênica, tornando-o menos diferenciado entre indivíduos da mesma espécie; além da estrutura compacta, organização simples e altas taxas de mutação (BEAUMONT; BOUDRY; HOARE, 2010; TRESBACH *et al.*, 2015). O DNAmit é caracterizado como uma molécula circular, rica em adenina e timina, com tamanho entre 14 kb a 20 kb nos vertebrados, e estrutura composta por dois genes que codificam RNAs ribossômicos (12S e 16S do rRNA), 22 genes que codificam RNAs

transportadores (tRNA) e 13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP (MEYER, 1993; WOLSTENHOLME, 1992).

Vinculado aos diferentes marcadores moleculares, em especial os mitocondriais, métodos de delimitação de espécies baseados em sequências únicas de DNA têm se tornado uma ferramenta útil na discriminação de espécies ou linhagens evolutivas que possuem limites morfológicos de difícil interpretação ou sobreposição de caracteres (SOUZA *et al.*, 2018). Vários métodos vêm sendo propostos para identificação e delimitação de linhagens moleculares, sendo os principais baseados em distâncias ou modelos probabilísticos (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013; PONS *et al.*, 2006; PULLANDRE; BROUILLET; ACHAZ, 2021; RATNASINGHAM; HEBERT, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

Os principais métodos utilizados para a delimitação de linhagens são o *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC) e *bayesian Poisson Tree Processes* (bPTP). O GMYC se baseia em modelos de coalescência para determinar o limite entre especiação e eventos coalescentes a partir de uma árvore ultramétrica (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013; PONS *et al.*, 2006); ASAP (*Assemble Species by Automatic Partitioning*), que utiliza um algoritmo de agrupamento hierárquico usando distâncias genéticas alinhadas, evitando a carga computacional da reconstrução filogenética (PULLANDRE; BROUILLET; ACHAZ, 2021), enquanto que o *bayesian Poisson Tree Processes* (bPTP) busca delimitar diretamente as linhagens usando diretamente o número de substituições de nucleotídeos das sequências, sem precisar de uma árvore ultramétrica (ZHANG *et al.*, 2013). Embora esses métodos sejam amplamente recomendados para delimitar espécies, algumas críticas são feitas a respeito da superdivisão, limitações nas análises de genes de *locus* único e precisão em relação a diferentes antecedentes em reconstruções filogenéticas inseridas (LUO *et al.*, 2018; TALAVERA; DINCĂ; VILA, 2013).

Outra ferramenta importante que vem ajudado a taxonomia tradicional é a utilização da morfometria geométrica (ADAMS; ROHLF; SLICE, 2009). A morfometria geométrica é baseada em coordenadas cartesianas de marcos anatômicos (*landmarks*) que permitem a exploração e visualização de um conjunto de dados e a união desses marcos, após a remoção dos efeitos de posição, escala e rotação através da sobreposição de Procrustes, compondo a forma do organismo em estudo, permitindo fazer inferências sobre as suas estruturas corporais (ADAMS;

OTÁROLA-CASTILLO, 2013; KENDALL, 1977; KLINGENBERG, 2022; MITTEROECKER; GUNZ, 2009).

A combinação de análises moleculares com a morfometria geométrica vem sendo utilizada para o estudo de peixes neotropicais que apresentam ampla distribuição e populações isoladas (ARGOLO *et al.*, 2020; BARRETO *et al.*, 2016; GARAVELLO *et al.*, 2021; GARCEZ *et al.*, 2018), ajudando a resolver questões taxonômicas como a identificação de espécies crípticas e diferentes linhagens evolutivas. No entanto, esses métodos podem apresentar resultados diferentes entre si (DONIN; FERRER; CARVALHO, 2022; GARCIA-MELO *et al.*, 2019), tornando a sua interpretação difícil.

Dentre os Siluriformes, um grupo extremamente grande e diverso de peixes com ocorrência predominante em água doce (NELSON; GRANDE; WILSON, 2016), encontra-se a família Callichthyidae, um grupo monofilético (BRITTO, 2003; DE PINNA, 1998; FERRARIS, 2007) de “cascudos” com o corpo coberto por duas séries de placas dérmicas (BONAPARTE, 1841) e que apresenta ampla distribuição ao longo do continente sul americano (REIS, 2003), com aproximadamente 220 espécies válidas, sendo a maior riqueza concentrada em *Corydoras*, com 186 espécies (ESCHMEYER *et al.*, 2023). Estudos com base em dados moleculares indicam que algumas espécies de Callichthyidae representam provavelmente um complexo com diferentes linhagens evolutivas, com baixa variedade morfológica e grande diferenciação genética (ALEXANDROU *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2013; DA ROCHA *et al.*, 2022; MARIGUELA *et al.*, 2013). A família Callichthyidae apresenta duas subfamílias, Callichthyinae e Corydoradinae, corroborados por dados morfológicos (REIS, 1998) e moleculares (SHIMABUKURO-DIAS *et al.*, 2004), sendo que a subfamília Corydoradinae possui três gêneros *Aspidoras* Ihering, 1907, *Corydoras* Lacepède 1803 e *Scleromystax* Günther 1864.

O gênero *Scleromystax* é considerado monofilético e composto pelas espécies *S. barbatus* (Quoy & Gaimard, 1824), *S. macropterus* (Regan, 1913), *S. prionotos* (Nijssen & Isbrücker 1980), *S. reisi* Britto, Fukakusa & Malabarba 2016, *S. salmacis* Britto & Reis 2005 e *S. virgulatus* (Nijssen & Isbrücker 1980), tendo sua distribuição limitada a riachos costeiros da Mata Atlântica entre o sul do estado da Bahia e norte do estado do Rio Grande do Sul (MENEZES *et al.*, 2007; BRITTO *et al.*, 2016). O “cascudinho” *Scleromystax barbatus* é a espécie que possui maior distribuição, ocorrendo desde o estado do Rio de Janeiro até o norte do estado de

Santa Catarina (MENEZES *et al.*, 2007). Este táxon se difere das outras espécies do grupo pela larga faixa negra longitudinal, desde a cabeça até a base dos raios da nadadeira caudal e pelo fato da cabeça possuir um padrão de estrias negras reticuladas sobre fundo branco (OYAKAWA *et al.*, 2006). Esta espécie vive em pequenos cardumes ou solitária em riachos e rios em locais rasos, com correnteza moderada a forte (OYAKAWA *et al.*, 2006). Sua alimentação é onívora, obtendo seu alimento explorando o substrato a procura de pequenos invertebrados, fragmentos vegetais e algas (GONÇALVES ; CESTARI, 2013).

Embora as populações de *S. barbatus* apresentem o mesmo padrão de colorido e morfologia ao longo de sua distribuição (DE BRITO; BUCKUP, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2017; MENEZES *et al.*, 2007; PINHEIRO; DALCIN; BATISTA, 2017), alguns estudos moleculares, não focados diretamente em entender a taxonomia dessa espécie, indicam que *S. barbatus* pode representar diferentes linhagens evolutivas (ALEXANDROU *et al.*, 2011; MARBURGER *et al.*, 2018; TSCHÁ *et al.*, 2017). Diante da grande distribuição geográfica e do fato de que muitas populações de *S. barbatus* parecem restritas às drenagens onde ocorrem nas bacias hidrográficas da Mata Atlântica, a utilização de uma metodologia molecular para a identificação e delimitação de linhagens, associada às análises morfológicas, pode auxiliar na detecção de divergências intrapopulacionais e na definição dos limites geográficos entre as diferentes unidades biológicas crípticas ao longo da área de ocorrência.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo principal elucidar as relações entre as diferentes linhagens evolutivas de *S. barbatus* ao longo de sua distribuição utilizando dados moleculares e de morfometria geométrica.

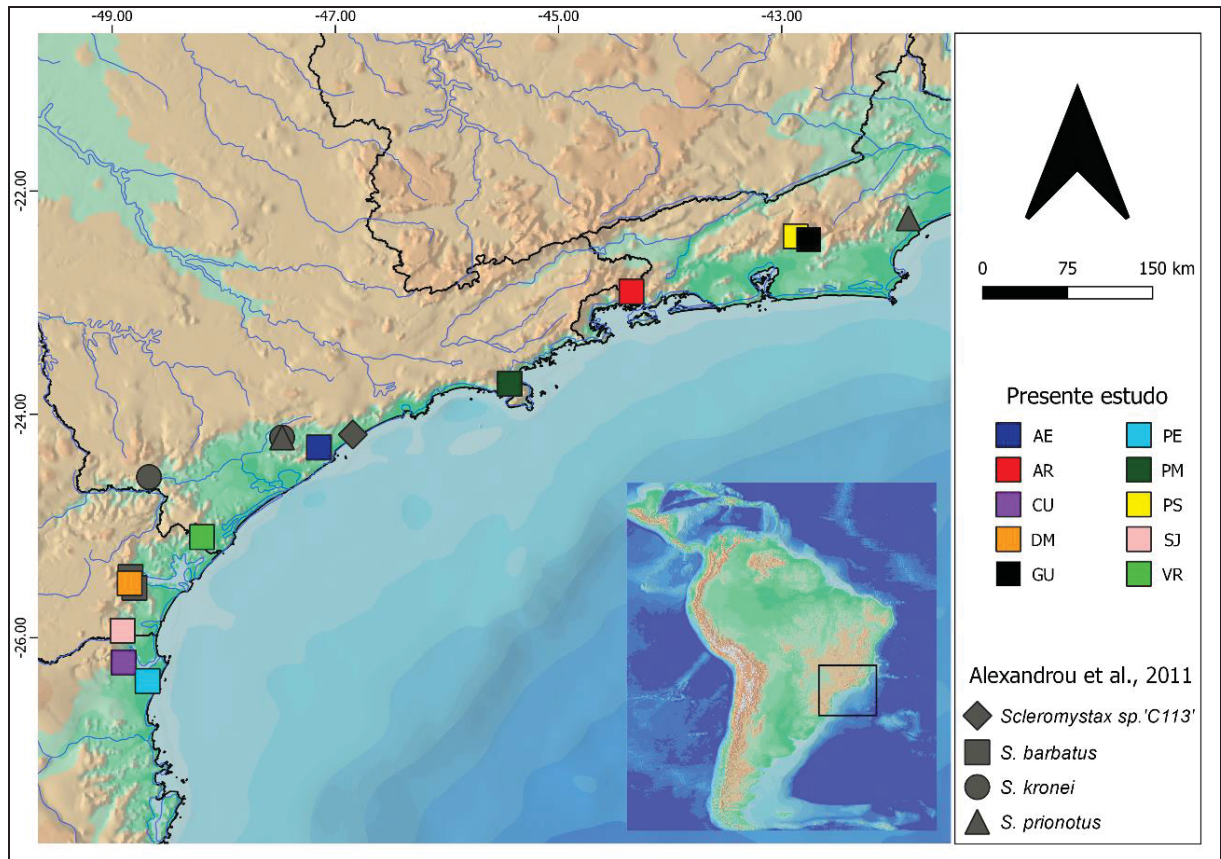
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

Indivíduos de dez populações de *S. barbatus* foram coletados entre 2019 e 2021 com auxílio de pesca elétrica e rede de arrasto ao longo de sua área de distribuição conhecida entre a bacia do rio Paraíba do Sul, no estado do Rio de Janeiro, até a bacia do rio Itapocu, na região norte do estado de Santa Catarina (FIGURA 3). Exemplares e amostras de tecidos (fragmentos de músculos e da nadadeira peitoral) foram preservados em etanol 100%. Material testemunho foi depositado na coleção ictiológica do Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI) (TABELA 1).

As coletas foram autorizadas pelo SISBIO (10320-1) e os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Seção de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEU/BIO-UFPR) processo 23075066050/2022-03 número 1489.

FIGURA 3 – Mapa das áreas amostrais utilizadas no presente estudo com as populações obtidas com dados primários (presente estudo) e dados secundários (ALEXANDROU *et al.*, 2011). legenda: AE – rio aerado, SP; AR – rio ariró, RJ; CU – rio cubatão, SC; DM – rio do meio, PR; GU – rio guapiaçu, RJ; PE – rio pernambuco, SC; PM – rio perequê mirim, SP; PS – rio paraíba do sul, RJ; SJ – rio são joão, SC; VR – vale do ribeira, SP.



Fonte: O autor (2023).

2.2 ANÁLISES MOLECULARES

2.2.1 Obtenção do genoma mitocondrial e escolha dos genes analisados

O genoma mitocondrial total de 4 espécimes oriundos de quatro populações (TABELA 5) foram extraídos pelo método salino e a pureza foi verificada em gel de agarose 1% e no NanoVue. O DNA extraído foi sequenciado sob a plataforma de sequenciamento DNBSeg (BGI Genomics, China), que gerou sequências paired-ended de 150pb. A qualidade dos dados limpos foi verificada usando o FASTQC. Em seguida, usamos a *pipeline* Getorganelle v1.7.6.1 (JIN *et al.*, 2020) para a montagem *de novo* do mitogenoma, usando sequências da base de dados Genbank

do gênero *Corydoras* como referência. Verificamos a circularidade do genoma com o software Bandage (WICK *et al.*, 2015). A anotação foi realizada na ferramenta MitoAnnotator (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/annotation/input.html>) incorporada na base de dados Mitofish v3.73 (IWASAKI *et al.*, 2013).

A partir dos mitogenomas foram feitas análises comparativas com o objetivo de encontrar os genes mais informativos para usar nas posteriores análises populacionais. Para isto, as sequências dos 13 genes codificantes foram concatenadas e alinhadas no software MEGA vX (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Foram feitas árvores para comparar as diferentes topologias. Além disso, analisamos os sítios variáveis e parsimoniosamente informativos usando também o software MEGA. A partir dessas informações foram escolhidos os genes NADH dehydrogenase 4 (*ND4*) e Citocromo b (*Cytb*) para as análises populacionais e biogeográficas da espécie *S. barbatus*. Além disso, foi utilizado o gene nuclear ativador de recombinação (*RAG1*) (TABELA 5). Mais detalhes estão disponíveis no Capítulo 1 da presente tese.

Foram utilizadas sequências dos genes *ND4*, *Cytb* e *RAG1* da base de dados do GenBank provenientes do trabalho de Alexandrou *et al.* (2011) para complementar os dados obtidos em campo, sendo que seis indivíduos são de *S. barbatus* e 11 de outras espécies pertencentes a *Scleromystax* (*S. macropterus*, *S. prionotos*, *Scleromystax* sp. 'CW42' e *Scleromystax Scleromystax* sp. 'C113' e *Scleromystax* sp. 'C112'), além de dois indivíduos de *Aspidoras poecilus* Nijssen & Isbrücker 1976 que foram utilizados como grupos externos. Todas as sequências foram obtidas na base de dados do GenBank.

TABELA 5 – Código utilizado nas análises, localidade, rio e coordenadas onde foram realizadas as coletas e número de indivíduos utilizados para o genoma mitocondrial (MITG) e em cada gene.

Código	Localidade	Rio	UTM	Genes				Voucher
				Mitg	Cytb	ND4	RAG1	
AE	Itariri-SP	Aerado	282136/ 7311146	1	5	5	5	MHNCI 12734
AR	Angra dos Reis - RJ	Ariró	567045/ 7467176	1	5	5	5	MHNCI 12735
CU	Joinville-SC	Cubatão Norte	710086/ 7097948	-	5	5	5	MHNCI 12831
DM	Paranaguá-PR	Do Meio	7176385/ 716803	-	5	5	5	MHNCI 12830
GU	Guapimirim-RJ	Guapiaçu	7517230/ 730669	-	5	5	5	MHNCI 12737
PE	Barra do Sul-SC	Pernambuco	731229/ 7079181	1	5	5	4	MHNCI 12736
PM	Caraguatatuba-SP	Pereque- Mirim	455433/ 7376043	-	5	5	5	MHNCI 12827
PS	Teresópolis-RJ	Vargem Grande	718825/ 7520595	1	2	2	1	MHNCI 12737
SJ	Guaratuba-PR	São João	709675/ 7129444	-	5	5	5	MHNCI 12834
VR	Jacupiranga-SP	Pequeno Tributário	782934/ 7221121	-	5	5	4	MHNCI 12828
Total				4	47	47	44	

Fonte: O autor (2023).

2.2.2 Extração de DNA e amplificação

O DNA das dez populações foram extraídos do tecido muscular dos espécimes preservados em álcool 96% através do método de extração salina (BRUFORD *et al.*, 1992), detalhes relacionados a localização das populações estão resumidos na TABELA 5. Para amplificar os genes mitocondriais *cytb* e ND4 foram usados os seguintes primers respectivamente desenhados para este trabalho SBCYTB-5'CTTCACATCGGACGAGGTCT 3'/SBCYTB-5'GTGATTGGGCGGAATGTGAG3' e SBND4F-5' ATCTAGGCACAGACCCCCTT 3'/SBND4R - 5' TTAGCAAGGCAGAAGAGGGC 3'. As condições de PCR para ambos os genes foram de acordo com o protocolo recomendado pela GoTaq® DNA Polymerase (Promega), conforme segue: 10µl de Buffer (1X (1,5mM MgCl₂)²), 1µl de PCR Nucleotide Mix (10mM), 1µl de forward primer (10mM), 1µl de reverse primer (10mM), 0,25µl de GoTaq® DNA Polymerase (1,25u), 2 µl de DNA molde (50 ng/ µl) e 34,75 µl de água ultrapura. O perfil térmico utilizado para ambos os genes foi o

seguinte: 2 min a 95°C seguido de 35 ciclos de 45s a 95°C, 30s a 60°C, e 1min30s a 72°C, com uma etapa de extensão final de 7min a 72°C.

O gene nuclear RAG1 foi amplificado com os seguintes primers: forward 5' - CTGAGCTGCAGTCAGTACCATAAGATGT-3' e reverse 5' - CTGAGTCCTTGTGAGCTTCCATRAAYTT-3' (SEVILLA *et al.*, 2007). As condições de amplificação da PCR foram as mesmas utilizadas para os genes mitocondriais. No entanto, o perfil térmico usado foi o seguinte: 2 min a 94°C seguidos de 36 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 53,1°C e 1 min45s a 72°C, com uma etapa de extensão final de 7min20s a 72°C.

Depois de amplificadas as amostras foram verificadas em gel de Agarose 1%, purificadas por Kit de purificação Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit, conforme orientações do fabricante. As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen Inc (Coréia do Sul).

2.2.3 Alinhamento das sequências e seleção dos modelos de substituição de nucleótideos

Todas as sequências foram alinhadas usando a ferramenta MUSCLE inserido no software Geneious versão 2023.1.1. A escolha do melhor modelo de substituição de nucleotídeos que se ajustasse aos dados de cada gene utilizado no presente estudo foi feita com o software jModelTest (POSADA, 2008) inserido no MEGA v10 (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021), onde os modelos de melhor ajuste foram selecionados usando critérios de informação Bayesiano (BIN) e critério de informação de Akaike (AICc) (NEI; KUMAR, 2000). Na TABELA 6 consta os melhores modelos para cada gene.

TABELA 6 – Modelo de substituição selecionado usando critérios de informação bayesiano (bin) e critério de informação de akaike (aicc) para cada gene utilizado nas análises. abreviações: +g= distribuição gama, +i = locais invariáveis evolutivamente, hky= hasegawa-kishino-yano, jc= jukes-cantor, k2= kimura 2-parameter, tn93= tamura-nei, t92: tamura 3-parameter

Gene	Modelo	BIN	AICc
Citocromo b	HKY+G	3727,96	2914,08
	TN93+G	3736,83	2914,66
	HKY+I	3737,25	2923,38
ND4	HKY+G	4615,20	3799,99
	T92+G	4615,88	3783,70
	T92+G+I	4624,14	3800,44
RAG1	K2+G	5748,03	4938,18
	K2+G+I	5751,63	4932,69
	JC+G	5752,43	4951,68

Fonte: O autor (2023).

2.2.4 Análises populacionais

Foram utilizadas sequências com 633 pb do gene mitocondrial Citocromo b, 767 pb do gene mitocondrial ND4 e 1475 pb do gene nuclear RAG1.

A diversidade nucleotídica e os índices de Fu's Fs e Tajima's D foram calculadas usando o software Arlequin, onde valores negativos para o índice de Fu's Fs e Tajima's D indicam expansão populacional (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007).

Para cada gene utilizado no presente estudo foi realizado uma análise de variância molecular (AMOVA) para a formação dos grupos foi utilizado as paleodrenagens de acordo com os trabalhos de DIAS et al. 2014 e (THOMAZ; KNOWLES, 2018), totalizando seis grupos: Grupo1 (CU, PE, SJ); Grupo2 (DM), Grupo3 (AE, VR), Grupo4 (PM), Grupo5 (AR), Grupo6 (GU,PS). Também estatísticas populacionais par a par Fst foram realizadas para estimar a diferenciação genética entre as populações (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008) usando o software Arlequin (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007) para ambas as análises. Para estatísticas populacionais par a par Fst, 1 indica que são totalmente diferentes e 0 que não apresentam nenhuma diferença entre si (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007). Redes de haplótipos foram construídas usando o método TCS (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000) implementado no

software PopArt v.1.7 (LEIGH; BRYANT, 2015) com os 3 genes selecionados para as análises.

2.2.5 Análises filogenéticas e delimitação de espécies

Para entender o melhor o limite entre as populações de *S. barbatus* estudadas foram estimadas as distâncias evolutivas entre as sequências de todos os genes analisados usando o modelo Kimura de 2 parâmetros (K2P) no MEGA v11 (KIMURA, 1980; TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021).

Foi construído uma árvore bayesiana utilizando uma matrix concatenada com os genes citocromo b (632 pb), ND4 (769 pb) e RAG1 (1475 pb) totalizando 2876 pb, no software BEAST v1.8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2012).

As análises obtidas foram produtos de uma corrida de 50 milhões de gerações MCMC. As topologias foram analisadas a cada 1000 gerações, com um burn-in de 10%, o resultado foi inspecionado no Tracer v1.6.0 (RAMBAUT *et al.*, 2014), finalmente a árvore foi analisada usando TreeAnnotator v. 1.8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2012).

Os resultados de três métodos automatizados de particionamento de linhagem foram comparados com o objetivo de discriminar se *S. barbatus* pertence a uma ou várias unidades taxonômicas. As análises incluíram três métodos: GMYC, PTP e ASAP. O modelo GMYC (*Generalized Model Yule Coalescent*) (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013) foi realizado a partir de uma árvore ultramétrica consenso construída no software BEAST v1.8 com 50 milhões de MCMC, e submetidas no site <http://species.h-its.org/gmyc/> usando o método *Single threshold*. O modelo PTP (*Poison Tree Process*) (ZHANG *et al.*, 2013) foi realizado a partir de uma árvore filogenética construída em Mr. Bayes e o site <http://species.h-its.org/ptp/> foi usado para gerar as análises, deixando os parâmetros por padrão. O modelo ASAP (*Assemble Species by Automatic Partitioning*) (PUILLANDRE; BROUILLET; ACHAZ, 2021) foi realizado no site <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/> usando como entrada um arquivo .fasta e o modelo de distância simples foi utilizado.

2.3 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

Um total de 165 indivíduos (86 fêmeas e 79 machos) representando as mesmas 10 populações de *S. barbatus* utilizadas nas análises moleculares foram empregadas para as análises de morfometria geométrica. Para complementar os dados obtidos em campo, 12 indivíduos da bacia do rio Paraíba do Sul foram emprestados pela coleção ictiológica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (tombo UFRJ 6057), uma vez que não foi possível obter indivíduos dessa população em campo (TABELA 7).

Para evitar os efeitos conhecidos da alometria ontogenética (FREDERICH; ADRIAENS; VANDEWALLE, 2008; KLINGENBERG, 2022; SIDLAUSKAS; MOL; VARI, 2011) foram utilizados somente espécimes adultos (> 40 mm de comprimento padrão). Por *S. barbatus* apresentar um acentuado dimorfismo sexual principalmente na região da cabeça e nadadeiras dorsal e peitorais (BRITTO, 2003), todas as análises relacionadas a morfometria geométrica foram realizadas de forma separada entre fêmeas e machos.

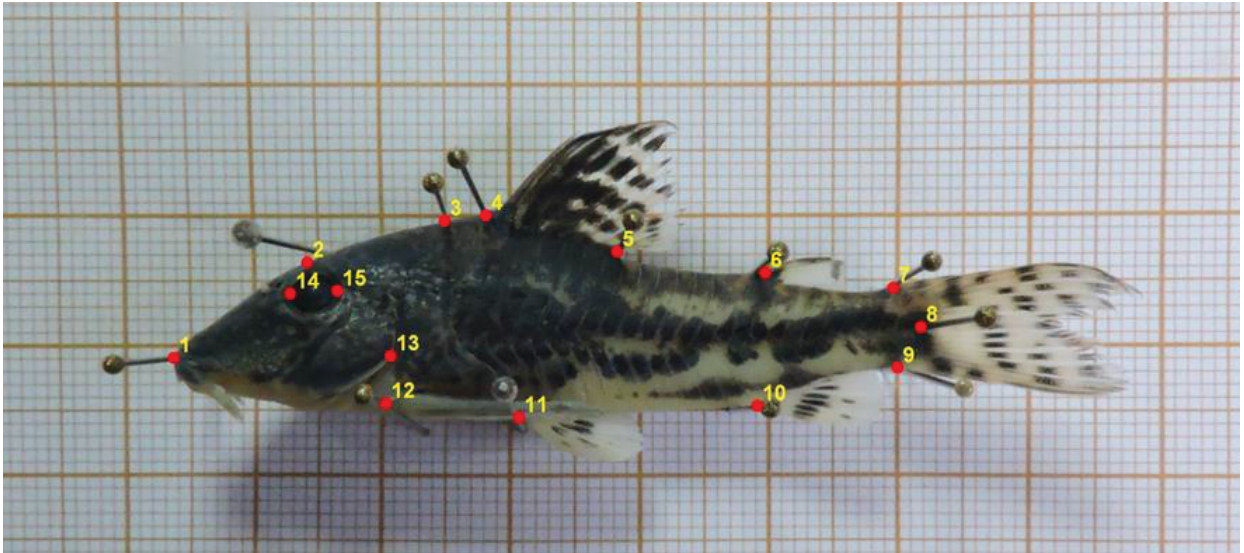
TABELA 7 – Código utilizado nas análises, localidade, rio e coordenadas onde foram realizados as coletas e número de indivíduos de cada população por sexo.

código	localidade	rio	utm	número de indivíduos	
				Fêmeas	Machos
AE	Itariri-SP	Aerado	282136/ 7311146	10	10
AR	Angra dos Reis - RJ	Ariró	567045/ 7467176	06	12
CU	Joinville-SC	Cubatão Norte	710086/ 7097948	13	05
DM	Paranaguá-PR	Do Meio	7176385/ 716803	13	03
GU	Guapimirim-RJ	Guapiaçu	7517230/ 730669	04	04
PE	Barra do Sul-SC	Pernambuco	731229/ 7079181	09	07
PM	Caraguatatuba-SP	Pereque-Mirim	455433/ 7376043	07	14
PS	Teresópolis-RJ	Bengala	718825/ 7520595	04	08
SJ	Guaratuba-PR	São João	709675/ 7129444	05	05
VR	Jacupiranga-SP	Pequeno Tributário	782934/ 7221121	15	11
Total				86	79

Fonte: O autor (2023).

O lado esquerdo do corpo de todos os espécimes foi fotografado usando uma câmera NIKON COOLPIX P520, sobre um fundo escalonado (FIGURA 4), posteriormente as fotos foram convertidas do formato JPEG para o formato TPS usando o software TPSUtil versão 1.81(ROHLF, 2004).

FIGURA 4 – Posição dos 15 landmarks utilizados nas análises de morfometria geométrica.



Fonte: O autor (2023).

Foram definidos 15 marcos anatômicos (*landmarks*) homólogos a todos os indivíduos (FIGURA 4 e TABELA 8) e que são relacionados a estruturas anatômicas de *S. barbatus* (ALEXANDROU *et al.*, 2011; REIS, 1998). Os marcos anatômicos foram inseridos nas fotos dos indivíduos utilizando o software TpsDIG2 versão 2.32 (ROHLF, 2005).

TABELA 8 – Landmarks utilizados nas análises de morfometria geométrica e suas respectivas posições.

Número do landmark	Posição
1	Ponta do focinho
2	Borda anterior do osso da ponte epifisária na linha média dorsal
3	Ponta posterior do osso supraoccipital na linha média dorsal
4	Origem do espinho da nadadeira dorsal
5	Base final posterior da nadadeira dorsal
6	Extremidade anterior da nadadeira adiposa
7	Início do primeiro raio da nadadeira caudal na borda superior
8	Borda posterior da placa hipural na linha média lateral
9	Início do primeiro raio da nadadeira caudal na borda inferior
10	Origem da nadadeira anal
11	Inserção da nadadeira pélvica
12	Inserção da nadadeira peitoral
13	Borda posterodorsal do osso do opérculo
14	Limite anterior do osso orbital
15	Limite posterior do osso orbital

Fonte: O autor (2023).

Para subseqüentes análises de morfometria geométrica foram utilizados os pacotes geomorph e morpho no ambiente R (ADAMS; OTÁROLA-CASTILLO, 2013; SCHLAGER, 2017; TEAM, 2019). O primeiro passo foi calcular a sobreposição pela Análise Generalizada de Procrustes a partir dos marcos anatômicos obtidos de cada indivíduo usando a função gpagen. Esse passo é importante remover informações não relacionadas a forma, como tamanho, orientação e posição dos indivíduos (ADAMS; ROHLF; SLICE, 2009; MONTEIRO; REIS, 1999). Inicialmente na Análise Generalizada de Procrustes, os centroides de cada configuração são movidos para a origem por translação, retirando assim o efeito de posição (SHERRATT, 2016). Numa segunda etapa todas as configurações são escalonadas a um tamanho comum (o chamado tamanho do centroide). Finalmente, as configurações são rotacionadas para minimizar as diferenças entre marcos anatômicos correspondentes (FORNEL; CORDEIRO-ESTRELA, 2012). Os outliers foram identificados e removidos usando a função plotOutliers.

Para visualizar as diferenças individuais na forma entre as populações estudadas de *S. barbatus*, uma análise de componentes principais (ACP) foi realizada usando a função gm.pcomp. Essa função realiza uma análise de componentes principais plotando em duas dimensões um conjunto de dados resultante do alinhamento da Análise Generalizada de Procrustes (SHERRATT, 2016).

Uma análise de variáveis canônicas (AVC) foi realizada para estimar a diferenciação entre as populações e entre os clados resultantes das análises filogenéticas. A probabilidade de um espécime pertencer a qualquer um dos grupos predefinidos foi estimada por meio da validação cruzada de jackknife dos escores de cada eixo (SCHLAGER, 2017). Foi utilizado a função CVA para as análises de variáveis canônicas e a função `typprobClass` para a validação cruzada ambas do pacote `morpho` (SCHLAGER, 2017)

A disparidade morfológica entre as populações estudadas e entre os clados resultantes das análises filogenéticas foram calculadas a partir da sobreposição de Procrustes usando a função `morphol.disparity`, que retorna valores de p associados a diferença entre os pares analisados (ADAMS; OTÁROLA-CASTILLO, 2013). A função estima a disparidade morfológica a partir de características morfológicas e realiza comparações pareadas para identificar diferenças entre os grupos (SHERRATT, 2016).

Para testar se existe uma correlação entre as análises filogenéticas e morfológicas o sinal filogenético foi estimado com uma versão modificada da estatística K , sendo que valores próximos de 1 indicam um forte sinal filogenético e valores próximos de 0 valores fracos (ADAMS, 2014) usando a função `physignal` (ADAMS; OTÁROLA-CASTILLO, 2013). Para isso, uma árvore com um único indivíduo de cada população foi criada usando o software BEAST v1.8.0 (DRUMMOND et al., 2012) e o indivíduo que melhor representa a média da distância de procrustes de cada população usando a função `findMeanSpec` (ADAMS; OTÁROLA-CASTILLO, 2013). Para visualizar a distribuição filogenética sobre o morfoespaço, foi utilizada a função `gm.prcomp` (ADAMS; OTÁROLA-CASTILLO, 2013), onde uma árvore filogenética é plotada sobre uma análise de componentes principais (ACP) (SHERRATT, 2016).

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISES POPULACIONAIS

Os resultados estatísticos da diversidade nucleotídica e dos índices de Fu's F_s e Tajima's D para os genes analisados constam nas TABELA 9, Fonte: O autor (2023).

TABELA 10 e

TABELA 11. Para o índice Fu's F_s todos os genes e populações estudadas de *S. barbatus* analisadas estão em expansão, com exceção de PM para o gene RAG1 apresentou valor positivo.

A expansão das populações foi reforçada pelo índice de Tajima's D para as populações CU, SJ, DM, AE e AR para o citocromo b (TABELA 9); as populações DM, VR, AE e AR para o gene ND4 (Fonte: O autor (2023).

TABELA 10); e as populações CU, PE, SJ, DM, VR e PM para o gene RAG1 (

TABELA 11). Somente a população DM apresentou valores negativos para ambos os índices em todos os genes.

Valores não calculados para os índices analisados estão relacionados a populações que não apresentaram variabilidade nos genes analisados.

TABELA 9 – diversidade nucleotídica e índices de Fu's Fs e Tajima's d para o gene mitocondrial citocromo b para cada população.

População	Diversidade Nucleotídica	Fu's Fs	Tajima's D
CU	0,002482 +/- 0,002112	-3,90135	-0,17475
PE	0	-	0
SJ	0,001418 +/- 0,001413	-5,40913	-0,97256
DM	0,007583 +/- 0,005203	-1,41093	-0,65430
VR	0,000955 +/- 0,001047	-6,27392	1,22474
AE	0,001452 +/- 0,001446	-5,40913	-0,97256
PM	0	-	0
AR	0,001896 +/- 0,001678	-4,29249	-1,04849
GU	0	-	0
PS	0	-	0

Fonte: O autor (2023).

TABELA 10 – Diversidade nucleotídica e índices de Fu's Fs e Tajima's d para o gene mitocondrial nd4 para cada população.

População	Diversidade Nucleotídica	Fu's Fs	Tajima's D
CU	0,002625 +/- 0,002061	-3,06805	0,27345
PE	0,000793 +/- 0,000868	-6,27392	1,22474
SJ	0,001971 +/- 0,001649	-3,73236	0,26212
DM	0,004694 +/- 0,003337	-1,90106	-1,18441
VR	0,002353 +/- 0,001889	-3,30387	-0,41017
AE	0,001628 +/- 0,001441	-4,29249	-1,04849
PM	0	-	0
AR	0,001553 +/- 0,001547	-5,40913	-0,97256
GU	0	-	0
PS	0,001304 +/- 0,001844	0	0

Fonte: O autor (2023).

TABELA 11 – diversidade nucleotídica e índices de Fu's Fs e Tajima's d para o gene nuclear RAG1.

População	Diversidade Nucleotídica	Fu's Fs	Tajima's D
CU	0,000271 +/- 0,000345	-7,58197	-0,81650
PE	0,000678 +/- 0,000672	-3,13549	-0,70990
SJ	0,000271 +/- 0,000345	-7,58197	-0,81650
DM	0,001085 +/- 0,000894	-3,57770	-1,09380
VR	0,000678 +/- 0,000672	-3,13549	-0,70990
AE	0,007864 +/- 0,005034	-0,14456	1,57274
PM	0,012610 +/- 0,007911	0,43576	-0,70314

AR	0,001085 +/- 0,000894	-3,57770	0,69900
GU	0,001085 +/- 0,000894	-3,57770	0,69900
PS	0	-	0

Fonte: O autor (2023).

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou alta variação para os genes citocromo b (66,57%) e ND4 (70,97%) entre os grupos e maior variação dentro das populações para RAG1 (TABELA 12). Resultado esperado pois os genes mitocondriais apresentam altas taxas de mutação (BEAUMONT; BOUDRY; HOARE, 2010) e por isso as populações isoladas tendem a demonstrar maior variabilidade entre si.

TABELA 12 – Análise da variância molecular (AMOVA) usando o gene mitocondrial citocromo b, nd4 e nuclear rag1. valores significativos menores que 0,05 constam como *.

Fatores	Grau de liberdade	Somatório dos quadrados	Variância	Porcentagem da variação	Índice de fixação
Citocromo b					
Entre grupos	5	290,069	6,22480	66,57	FCT 0,66566*
Entre populações dentro dos grupos	4	54,833	2,64545	28,29	FSC 0,84613*
Dentro das populações	37	17,800	0,48108	5,14	FST 0,94855*
Total	46	362,702	9,35134		
ND4					
Entre grupos	5	473,952	10,59202	70,97	FCT 0,70968*
Entre populações dentro dos grupos	4	75,633	3,64383	24,41	FSC 0,84094*
Dentro das populações	37	25,500	0,68919	4,62	FST 0,95382*
Total	46	575,085	14,92504		
RAG1					
Entre grupos	5	70,244	1,27728	30,23	FCT 0,30226*
Entre populações dentro dos grupos	4	22,906	0,75439	17,85	FSC 0,25586*
Dentro das populações	34	74,600	2,19412	51,92	FST 0,48078*

Total	43	167,750	4,22579	
-------	----	---------	---------	--

Fonte: O autor (2023).

Valores próximos de 1 para as análises populacionais par a par F_{st} indicam que as populações analisadas são diferentes entre si. Para os genes mitocondriais analisados (citocromo b e ND4) as populações apresentaram em sua maioria valores próximos de 1 e algumas populações para o citocromo b se mostraram totalmente diferenciadas como pode ser observado na TABELA 13 e TABELA 14. Somente as populações CU e PE apresentaram valores baixos para F_{st} e valor de $p > 0,05$ e DM apresentou valores intermediários quando comparado com CU, PE e SJ para ambos os genes, no entanto somente foi encontrada diferenças significativas entre DM e CU.

TABELA 13 – Estatísticas populacionais par a par FST para o gene mitocondrial citocromo b. diferenças significativas ($p < 0,05$) são mostrados na diagonal acima com o símbolo +.

Pop	CU	PE	SJ	DM	VR	AE	PM	AR	GU	PS
CU			+	-	+	+	+	+	+	+
PE	0,29167	-	+	+	+	+	+	+	+	+
SJ	0,86354	0,95238		+	+	+	+	+	+	+
DM	0,58546	0,66667	0,72000		+	+	+	+	+	+
VR	0,87500	1,00000	0,95238	0,71429		+	+	+	+	+
AE	0,89224	0,96364	0,93846	0,77564	0,92000		+	+	+	+
PM	0,96780	1,00000	0,98519	0,91045	1,00000	0,98246		+	+	+
AR	0,95117	0,98425	0,97080	0,89313	0,98131	0,96721	0,98485		+	+
GU	0,96336	1,00000	0,98400	0,89916	1,00000	0,98198	1,00000	0,93750		+
PS	0,93930	1,00000	0,97344	0,83573	1,0000	0,96995	1,00000	0,90148	1,00000	

Fonte: O autor (2023).

TABELA 14 – Estatísticas populacionais par a par FST para o gene mitocondrial nd4. diferenças significativas ($p < 0,05$) são mostrados na diagonal acima com o símbolo +.

Pop	CU	PE	SJ	DM	VR	AE	PM	AR	GU	PS
CU			+	+	+	+	+	+	+	+
PE	-,08333		+	+	+	+	+	+	+	+
SJ	0,87762	0,94108		+	+	+	+	+	+	+
DM	0,59064	0,70339	0,67262		+	+	+	+	+	+
VR	0,91667	0,95183	0,93806	0,84137		+	+	+	+	+
AE	0,91837	0,95491	0,94104	0,83957	0,84375		+	+	+	+
PM	0,97653	0,99296	0,99010	0,95187	0,98423	0,98558		+	+	+
AR	0,96281	0,98138	0,97826	0,93560	0,97211	0,97497	0,98485		+	+
GU	0,94582	0,96429	0,95927	0,91385	0,95351	0,95676	0,96140	0,84896		+
PS	0,95835	0,98421	0,97945	0,91940	0,96927	0,97371	0,99319	0,90846	0,67764	

Fonte: O autor (2023).

O gene nuclear RAG1 apresentou um padrão de estruturação regional em que as populações mais próximas são mais semelhantes (TABELA 15), como por exemplo as populações CU, PE, SJ e DM que estão localizadas mais ao sul da distribuição de *S. barbatus* e possuem pouca variação entre si, mas quando comparadas com populações distribuídas mais ao norte (AR, GU e PS) os valores encontrados para Fst são maiores.

TABELA 15 – estatísticas populacionais par a par FST para o gene nuclear rag1. diferenças significativas ($p = < 0,05$) são mostrados na diagonal acima com o símbolo +.

Pop	CU	PE	SJ	DM	VR	AE	PM	AR	GU	PS
CU		+	+	-	+	+	+	+	+	+
PE	0,60751		-	-	-	-	+	+	+	+
SJ	0,71429	0,02542		-	+	-	+	+	+	+
DM	0,37500	-0,01293	0,00000		+	+	+	+	+	+
VR	0,69777	0,27273	0,44039	0,26448		-	+	+	+	+
AE	0,28571	0,13455	0,18919	0,14948	0,18455		+	+	+	-
PM	0,42073	0,32801	0,38312	0,34923	0,34783	0,20021		-	+	-
AR	0,83871	0,75698	0,80769	0,70370	0,77715	0,40000	0,32667		+	-
GU	0,88889	0,83871	0,87500	0,79487	0,84785	0,52174	0,41954	0,73684		-
PS	0,94444	0,84615	0,93548	0,73333	0,85714	0,03333	-0,25676	0,57895	0,38462	

Fonte: O autor (2023).

As distâncias par a par usando o modelo de Kimura de 2 parâmetros entre as populações de *S. barbatus* variou de 0,27% a 5,21% para o citocromo b (TABELA 16), de 0,15% para o ND4 (

TABELA 17) e de 0,06% a 0,73% para o RAG1 (TABELA 18). As maiores distâncias par a par foi maior entre as populações que estão mais afastadas e ficaram mais evidentes para os genes mitocondriais (Citocromo b e ND4).

A população PM apresentou uma diferença maior que 2% quando comparada com todas as demais populações para ambos os genes mitocondriais, indicando que esta população é uma linhagem evolutiva diferente (TABELA 16 e

TABELA 17). Para o ND4, a população PS também apresentou diferenças maiores de 2% em relação as demais populações (TABELA 17).

TABELA 16 – Estimativas de divergência evolutiva sobre pares de sequências entre as populações de *Scleromystax barbatus* estudadas para o gene citocromo b. valores destacados em vermelho indicam uma diferenciação maior que 2%.

	AE	AR	CU	GU	DM	PE	PM	PS	SJ
--	----	----	----	----	----	----	----	----	----

AR	4,68%									
CU	2,10%	4,87%								
GU	4,05%	1,23%	4,28%							
DM	2,10%	4,87%	1,39%	4,22%						
PE	1,85%	4,74%	0,27%	4,09%	1,17%					
PM	4,17%	5,13%	4,93%	3,73%	4,79%	4,66%				
PS	2,99%	2,54%	3,45%	1,71%	3,55%	3,28%	4,07%			
SJ	2,31%	5,21%	1,67%	4,58%	1,73%	1,45%	4,97%	3,85%		
VR	0,90%	3,91%	1,26%	3,45%	1,45%	1,05%	3,65%	2,66%	1,51%	

Fonte: O autor (2023).

TABELA 17 – ESTIMATIVAS DE DIVERGÊNCIA EVOLUTIVA SOBRE PARES DE SEQUÊNCIAS ENTRE AS POPULAÇÕES DE *Scleromystax barbatus* ESTUDADAS PARA O GENE ND4. VALORES DESTACADOS EM VERMELHO INDICAM UMA DIFERENCIAÇÃO MAIOR QUE 2%.

	AE	AR	CU	GU	DM	PE	PM	PS	SJ
AR	6,41%								
CU	2,72%	6,034							
GU	6,10%	1,63%	6,093						
DM	2,05%	5,42%	0,91%	5,292					
PE	2,78%	6,03%	0,15%	6,10%	0,94%				
PM	6,45%	4,36%	6,66%	4,69%	5,82%	6,65%			
PS	4,65%	3,05%	5,27%	2,64%	4,48%	5,29%	5,30%		
SJ	2,37%	5,84%	1,59%	5,73%	0,94%	1,65%	6,36%	4,95%	
VR	1,13%	6,27%	2,81%	6,04%	2,15%	2,86%	6,97%	4,54%	2,46%

Fonte: O autor (2023).

TABELA 18 – Estimativas de divergência evolutiva sobre pares de sequências entre as populações de *Scleromystax barbatus* estudadas para o gene rag1.

	AE	AR	CU	GU	DM	PE	PM	PS	SJ
AR	0,37%								
CU	0,19%	0,42%							
GU	0,56%	0,42%	0,62%						
DM	0,15%	0,37%	0,11%	0,53%					
PE	0,14%	0,37%	0,12%	0,57%	0,09%				
PM	0,61%	0,57%	0,66%	0,73%	0,60%	0,61%			
PS	0,27%	0,30%	0,29%	0,35%	0,23%	0,24%	0,57%		
SJ	0,13%	0,36%	0,10%	0,56%	0,08%	0,06%	0,60%	0,23%	
VR	0,18%	0,41%	0,15%	0,60%	0,12%	0,09%	0,65%	0,27%	0,08%

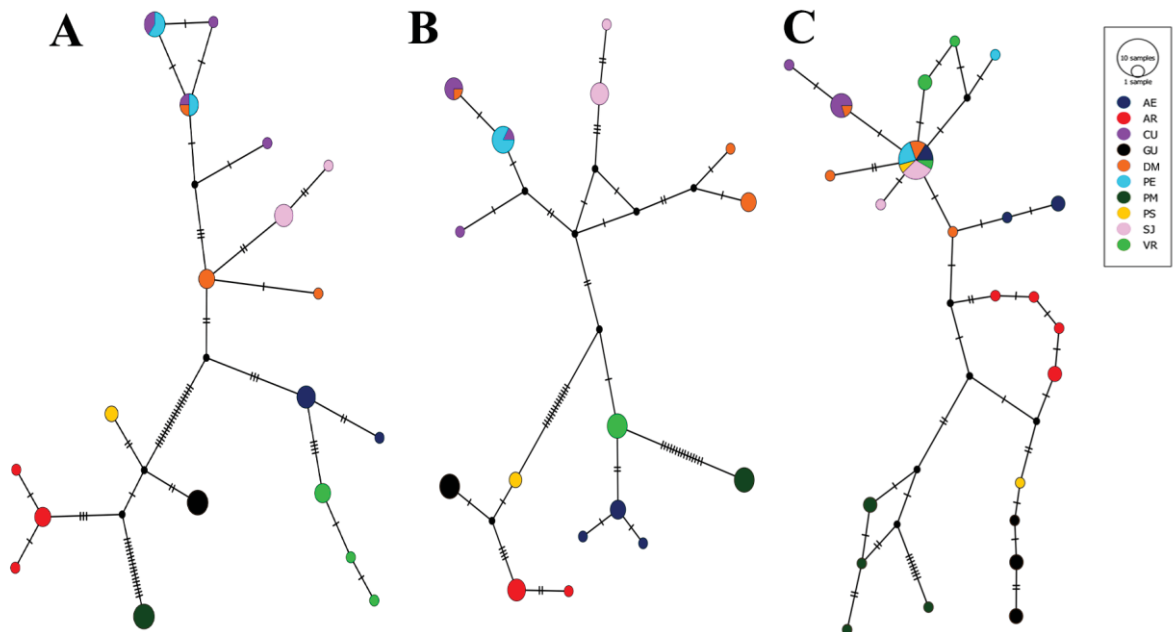
Fonte: O autor (2023).

As redes de haplótipos para os genes mitocondriais citocromo b com 16 haplótipos e ND4 com 19 haplótipos corroboram os resultados obtidos para os valores de F_{st} em que as populações analisadas apresentaram haplótipos exclusivos e pouco compartilhamento entre si com exceção das populações CU e

PE (FIGURA 5). Ambas as redes apresentaram uma estruturação baseado na distribuição das populações utilizadas no presente estudo, onde as espécies que estão inseridas mais ao sul (AE + CU + DM + PE + SJ + VR) estão mais relacionadas entre si e outra estruturação envolvendo as espécies distribuídas mais ao norte (AR + GU + PS).

A principal diferença entre as redes de haplótipos dos genes mitocondriais é que população denominada como PM ficou mais próxima de VR e AE para o citocromo b e para o gene ND4 mais perto de AR, GU e PS. A população PM está inserida na porção norte do litoral de São Paulo e fica entre as populações citadas acima sendo que VR e AE estão mais ao sul da sua distribuição e AR, GU e PS mais ao norte (FIGURA 5). No entanto para ambas as redes de haplótipos, a população PM apresentou altas taxas de mutações, indicando que essa população é diferente das demais.

FIGURA 5 – Distribuição dos haplótipos de *S. barbatus* usando os genes mitocondriais nd4 (a) e citocromo b (b) e o gene nuclear rag1 (c). todos os grupos são representados seguindo o esquema de cores estabelecido na fig. 1.



Fonte: O autor (2023).

A rede de haplótipos para o gene nuclear RAG1 apresentou 23 haplótipos e também corroborou os resultados obtidos para as análises de Fst (FIGURA 5), onde as populações localizadas mais ao sul (AE + CU + DM + PE + SJ + VR) apresentam um grande compartilhamento de haplótipos entre si e as populações localizadas mais ao norte (AE + GU + PM + PS) possuem haplótipos mais exclusivos (FIGURA 5).

3.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES

Foram obtidos 67 sequências dos três genes utilizados sendo 48 do presente estudo e 19 do trabalho de Alexandrou *et al.* (2011), resultando em uma matriz combinada com 2876 pb (citocromo b, 6332pb; ND4, 769pb; RAG1, 1475pb).

A árvore concatenada com os genes utilizados no presente estudo separou as populações de *S. barbatus* em quatro clados com altos valores de suporte nos ramos (FIGURA 6). O primeiro grupo (clado A) engloba as populações inseridas nas drenagens costeiras no estado do Rio de Janeiro (AR + GU + PS); o segundo grupo (clado B) é formado por uma única população localizada no litoral norte do estado de São Paulo (PM); o terceiro grupo (clado C) é formado pelas populações inseridas no vale do ribeira e litoral sul de São Paulo (AE + VR) e as populações *Scleromystax* sp. 'C112', *Scleromystax* sp. 'C113' e *S. kronei*; e o quarto grupo (clado D) é formado pelas populações localizadas mais ao sul da distribuição de *S. barbatus* que se estende desde a bacia do Itapocu no norte do estado de Santa Catarina até as drenagens costeiras inseridas no estado do Paraná (FIGURA 3).

A árvore concatenada também recuperou as demais espécies de *Scleromystax* como grupos monofiléticos, destacando que *Scleromystax* sp. 'CW42' provavelmente representa uma unidade taxonômica (FIGURA 6).

As árvores filogenéticas para cada gene apresentaram topologias semelhantes com exceção da população PM que na árvore utilizando somente o citocromo b formou um grupo isolado (

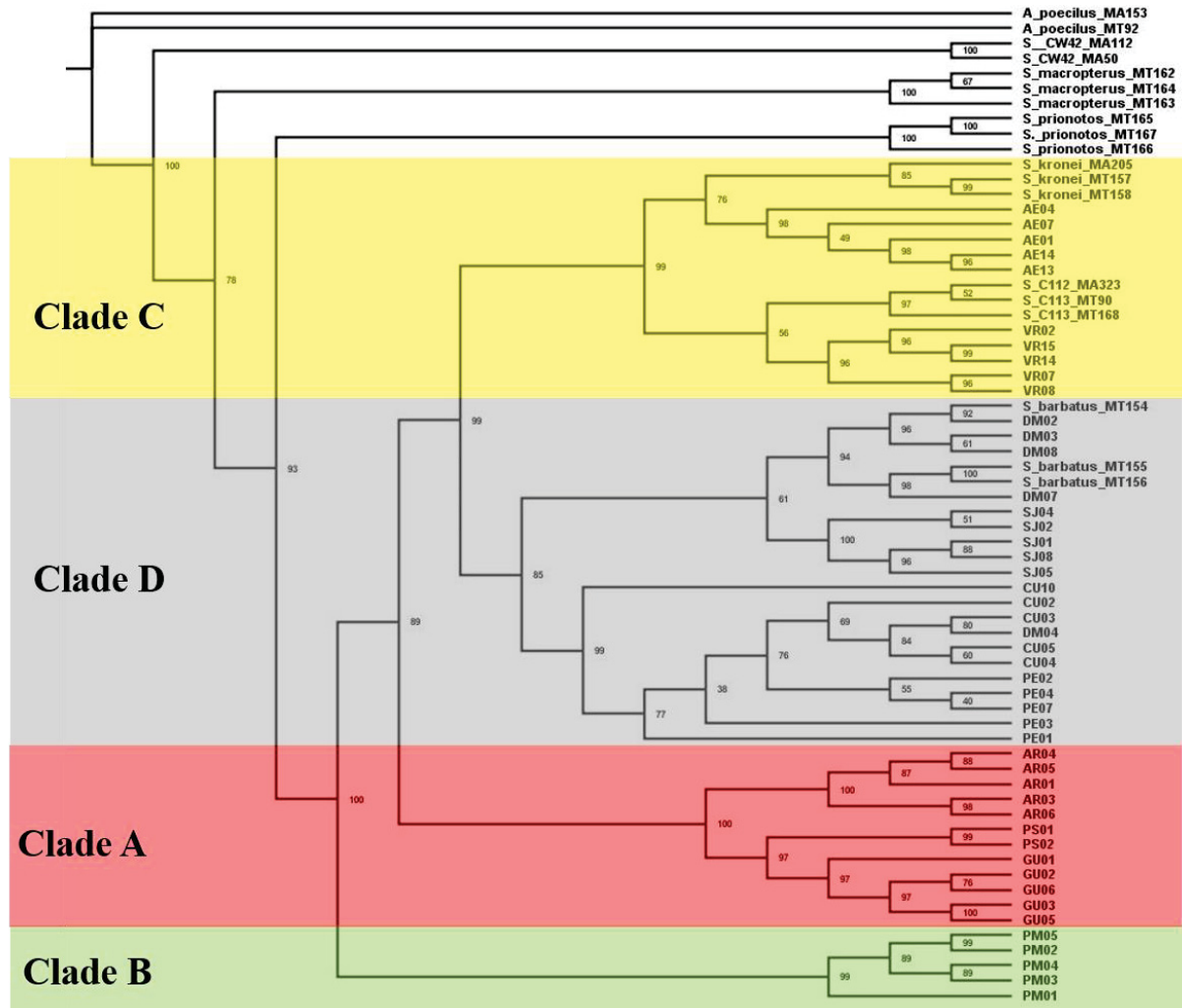
FIGURA 7), na árvore com o ND4 ficou mais relacionado das populações do norte (AR + GU + PS) (Fonte: O autor (2023).

FIGURA 8) e na árvore utilizando o RAG1 formou um clado irmão das demais populações de *S. barbatus* assim como com o citocromo b (Fonte: O autor (2023).

FIGURA 9). O citocromo b foi o gene que apresentou um resultado mais semelhante ao visto com a árvore concatenada.

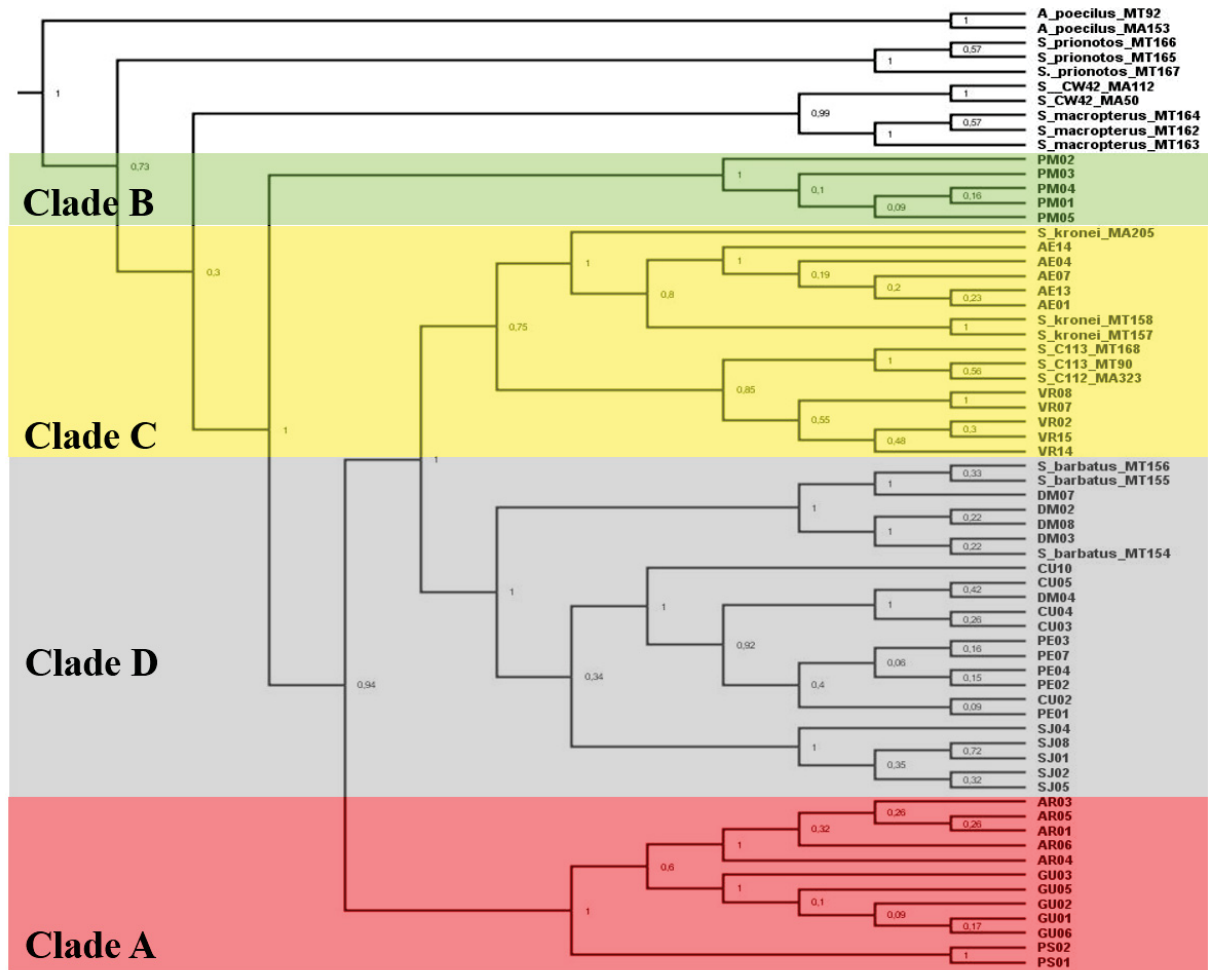
A árvore concatenada e o RAG1 recuperaram *S. prionotos* como grupo irmão de *S. barbatus* e as árvores baseada no Citocromo b e ND4 recuperaram *S. macropterus* como grupo mais próximo. Diferente das demais o gene ND4 não recuperou a monofilia de *Scleromystax*, colocando *S. prionotos* como grupo mais basal (FIGURA 8).

FIGURA 6 – Árvore filogenética de *Scleromystax barbatus* construída a partir dos genes mitocondriais citocromo b + nd4 e o gene nuclear rag1. valores de suporte dos ramos estão representados em números arábicos.



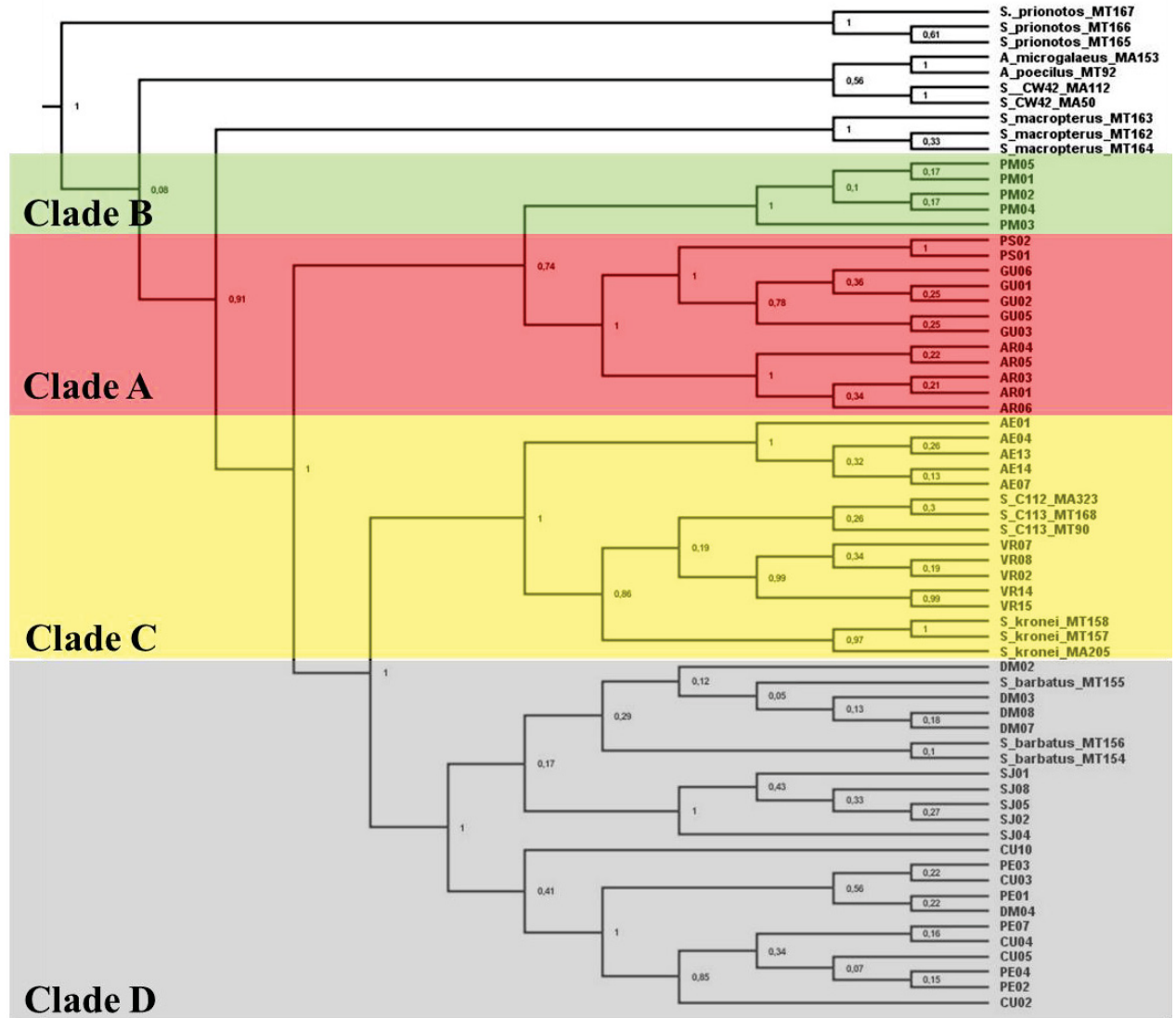
Fonte: O autor (2023).

FIGURA 7 – Árvore filogenética de *Scleromystax barbatus* construída a partir do gene mitocondrial citocromo b. valores de suporte dos ramos estão representados em números arábicos.



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 8 – Árvore filogenética de *Scleromystax barbatus* construída a partir do gene mitocondrial nd4. valores de suporte dos ramos estão representados em números arábicos.



Fonte: O autor (2023).

Os modelos utilizados para as análises de delimitações de espécies apresentaram diferentes resultados para cada gene, com o modelo ASAP sendo mais conservador e indicando uma quantidade menor de possíveis Unidades Taxonômicas Evolutivas Moleculares (MOTUs) e o modelo PTP para o gene ND4 sendo menos conservado e indicando uma quantidade maior de possíveis MOTUs (TABELA 19 E Fonte: O autor (2023)).

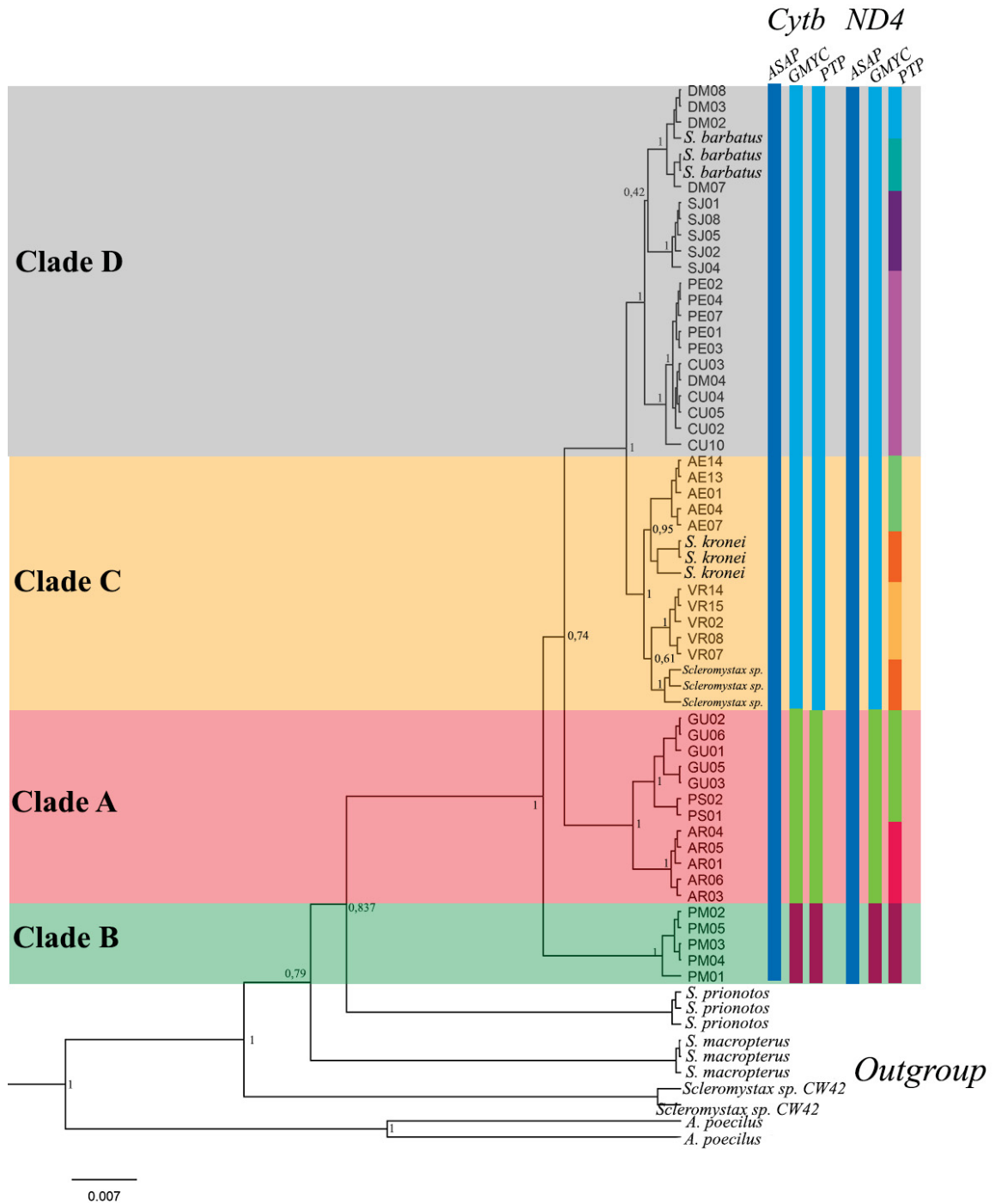
FIGURA 10).

TABELA 19 – Quantidade de MOTUs estipulada para cada modelo de delimitações de espécies e para cada gene mitocondrial utilizado no presente estudo. ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning), GMYC (Generalized Godel Yule Coalescent) e PTP (Poison Tree Process).

Gene	ASAP	GMYC	PTP
Citocromo b	01	03	03
ND4	01	03	10

Fonte: O autor (2023).

FIGURA 10 – Resultado dos modelos de delimitação de espécie para cada gene mitocondrial utilizado. ASAP (Assemble Species By Automatic Partitioning); GMYC (Generalized Model Yule Coalescence); PTP (Poison Tree Processes).

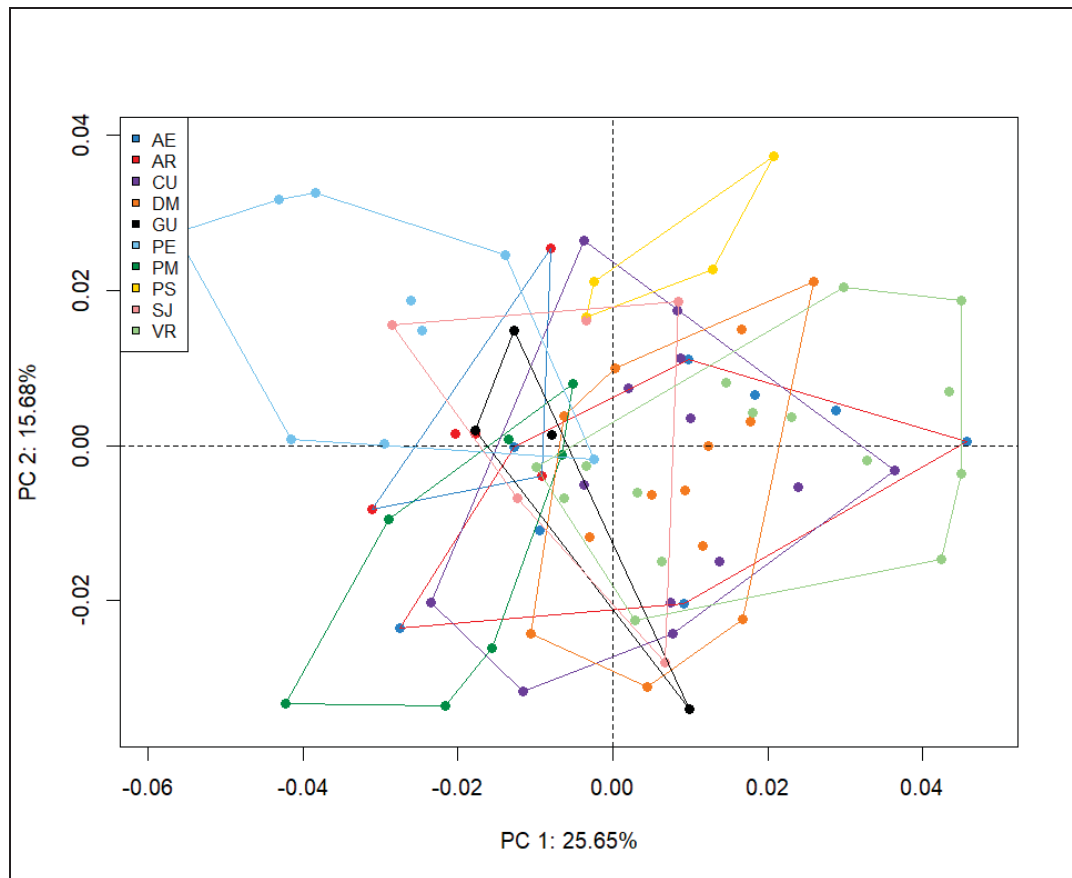


Fonte: O autor (2023).

3.3 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

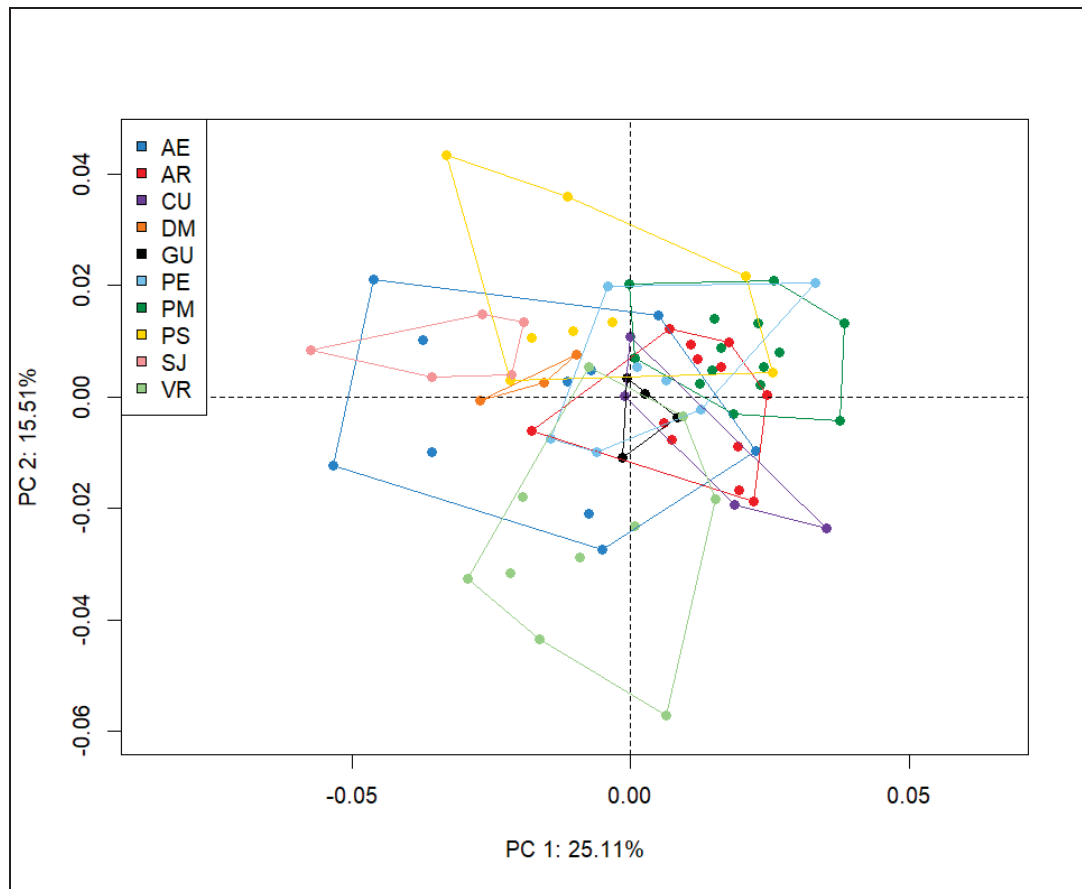
As análises de componentes principais (ACP) não separou de forma nítida nenhuma população de *S. barbatus*, tanto para fêmeas como para machos (FIGURA 11 e FIGURA 12). Para as fêmeas o primeiro eixo explicou 25,65% e o segundo 15,68% da variação acumulada (FIGURA 11). Para os machos, o primeiro eixo explicou 25,11% e o segundo 15,51% da variação acumulada.

FIGURA 11 – Análise dos componentes principais entre exemplares fêmeas das populações de *Scleromystax barbatus*. todos os grupos são representados seguindo o esquema de cores estabelecido na FIGURA 1.



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 12 – Análise dos componentes principais entre exemplares machos das populações de *Scleromystax barbatus*. todos os grupos são representados seguindo o esquema de cores estabelecido na FIGURA 1.



Fonte: O autor (2023).

As análises canônicas utilizando as populações como grupos pré-definidos explicou melhor a variação acumulada, com 56,1% para fêmeas e 65,5% para machos (FIGURA 13 e Fonte: O autor (2023)).

FIGURA 14). A precisão da validação cruzada de Jackknifed foi de 85,54% para as fêmeas e 87,01% para os machos, sendo que sete indivíduos das fêmeas e sete dos machos foram considerados “outliers” e não se encaixaram em nenhum grupo pré-definido (TABELA 20 e TABELA 21).

Para as fêmeas os grupos AR (Angra do Reis-RJ), CU (Joinville-SC), VR (Jacupiranga-SP) e GU (Guapimirim-RJ) formaram grupos separados e os demais apresentando uma grande sobreposição (FIGURA 13). Para os machos, as

GU	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PE	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	71,4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	28,6
PM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	87,5	0,00	0,00	0,00	12,5
SJ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	60,0	0,00	0,00	40,0
VR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	90,0	0,00	10,0

Fonte: O autor (2023).

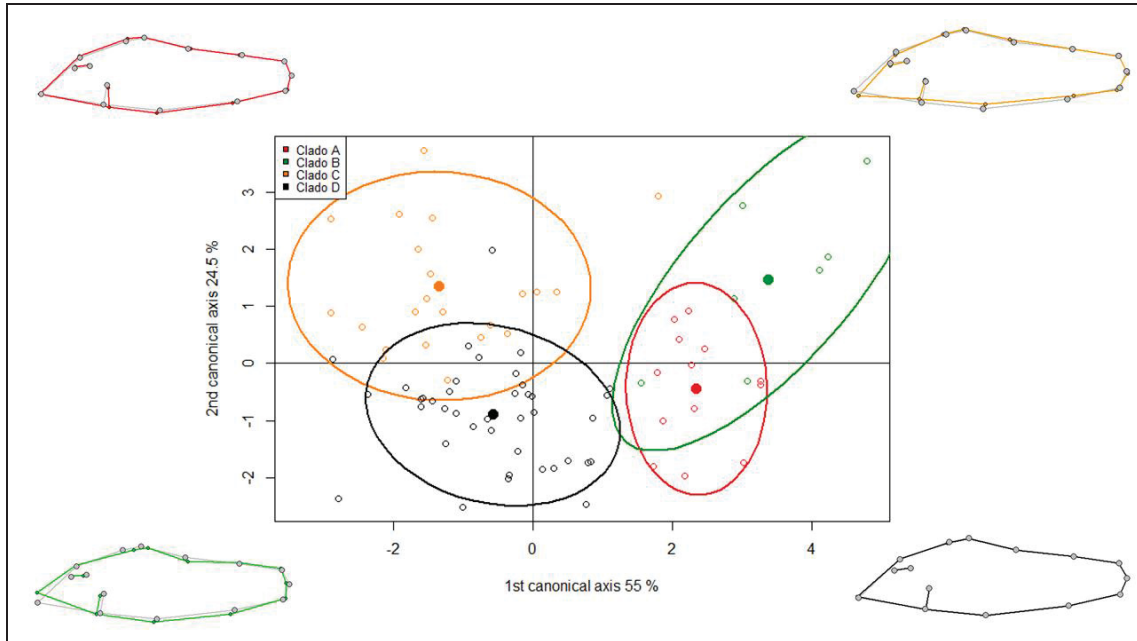
As análises canônicas utilizando os clados baseados nas árvores filogenéticas como grupos pré-definidos explicou a variação acumulada com 79,5 para fêmeas e 84,7% para machos (FIGURA 15 e Fonte: O autor (2023).

FIGURA 16). A precisão da validação cruzada de Jackknifed foi de 89,15% para as fêmeas e 87,01% para os machos, sendo que um indivíduo dos machos foi considerado “outliers” e não se encaixou em nenhum grupo pré-definido (TABELA 22 e TABELA 23).

Para as fêmeas houve a formação de dois grupos onde o primeiro é composto pelos Clado A e B que possuem uma distribuição mais ao norte e o segundo é formado pelos Clado C e D que engloba as populações do Vale do Ribeira e da porção mais sul da distribuição de *S. barbatus* (FIGURA 15). Para os machos também foi observado a formação de dois grupos, porém o primeiro é formado somente pelo Clado B e o segundo pelos clado A, C e D (Fonte: O autor (2023).

FIGURA 16).

FIGURA 15 – Análise de variáveis canônicas (AVC) para as fêmeas mostrando a diferenciação entre grupos definidos a priori (clados), elipses de confiança de 80% são mostradas para cada grupo. A representação do corpo segue a legenda das análises canônicas e a forma média de todas as fêmeas é destacado em cinza. os clados foram estabelecidos de acordo com a FIGURA 6.



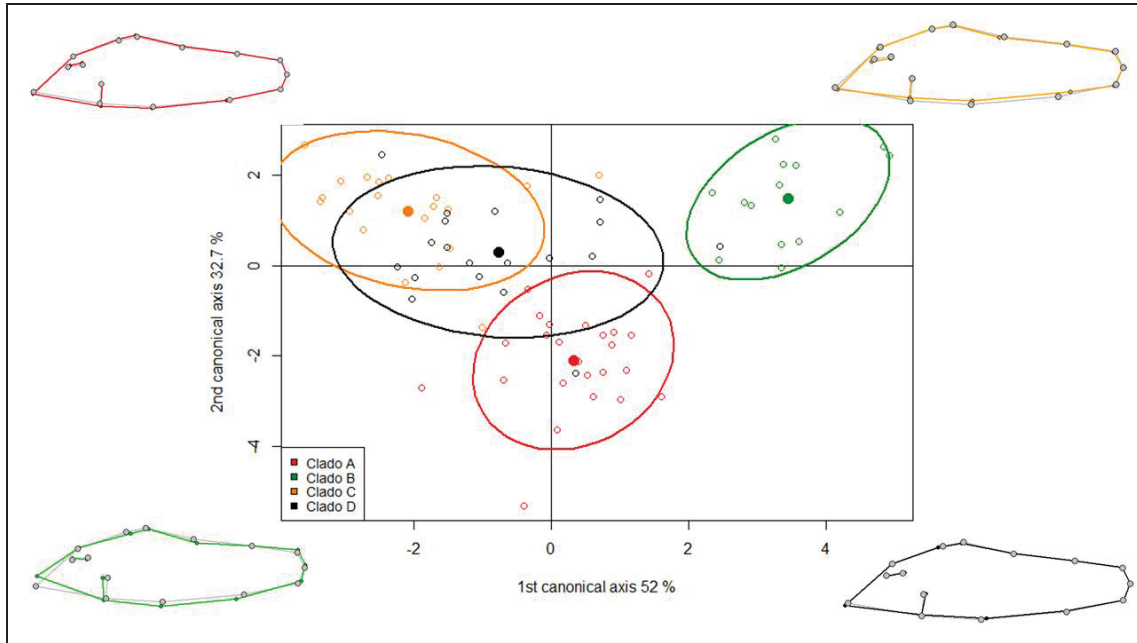
Fonte: O autor (2023).

TABELA 22 – Validação cruzada de Jackknifed baseada nos escores das variáveis canônicas para todo o conjunto de dados de 15 marcos anatômicos das fêmeas. Cada valor representa a porcentagem de espécimes atribuídos aos grupos definidos no AVC.

Clados	A	B	C	D
A	100	0,00	0,00	0,00
B	0,00	85,8	0,00	14,2
C	0,00	4,35	86,9	8,69
D	5,00	0,00	7,50	87,5

Fonte: O autor (2023).

FIGURA 16 – Análise de variáveis canônicas (AVC) para os machos mostrando a diferenciação entre grupos definidos a priori (clados), elipses de confiança de 80% são mostradas para cada grupo. A representação do corpo segue a legenda das análises canônicas e a forma média de todas as fêmeas é destacado em cinza. os clados foram estabelecidos de acordo com a FIGURA 6.



Fonte: O autor (2023).

TABELA 23 – Validação cruzada de Jackknifed baseada nos escores das variáveis canônicas para todo o conjunto de dados de 15 marcos anatômicos dos machos. Cada valor representa a porcentagem de espécimes atribuídos aos grupos definidos no AVC. Os espécimes que não foram atribuídos a nenhum dos grupos são tratados como outliers colocados na coluna “outlier”.

Clados	A	B	C	D	outlier
A	87,5	0,00	0,00	8,33	4,16
B	0,00	100	0,00	0,00	0,00
C	5,00	5,00	80,0	10,0	0,00
D	5,26	5,26	5,26	84,2	0,00

Fonte: O autor (2023).

As análises de disparidade morfológica para fêmeas e machos mostrou que algumas populações são diferentes entre si apesar de não ficar claro nas ACP e nas AVC (TABELA 24 e TABELA 25). A maior variação foi encontrada em AE que apresentou diferenças para AR, CU, DM, PM e PS para as fêmeas e para os machos foi para AR, DM, GU e PM. Além das diferenças encontradas acima, foram encontradas diferenças entre AR e PE, AR e VR para as fêmeas e entre os machos foram encontradas diferenças entre DM e PS, DM e VR, GU e PE, GU e PS, GU e VR, PM e PS, PM e VR.

TABELA 24 – Disparidade morfológica entre as fêmeas das populações de *S. barbatus*. Valores significativos de p ($< 0,05$) estão destacados em negrito.

	AE	AR	CU	DM	GU	PE	PM	PS	SJ
AR	0,014								
CU	0,057	0,358							

DM	0,040	0,471	0,834						
GU	0,117	0,640	0,826	0,914					
PE	0,712	0,043	0,125	0,099	0,185				
PM	0,044	0,678	0,615	0,745	0,881	0,064			
PS	0,028	0,955	0,383	0,476	0,610	0,052	0,675		
SJ	0,122	0,523	0,903	0,973	0,918	0,210	0,747	0,497	
VR	0,547	0,041	0,126	0,101	0,207	0,853	0,064	0,062	0,219

Fonte: O autor (2023).

TABELA 25 – Disparidade morfológica entre os machos das populações de *S. barbatus*. Valores significativos de p ($< 0,05$) estão destacados em negrito.

	AE	AR	CU	DM	GU	PE	PM	PS	SJ
AR	0,004								
CU	0,097	0,854							
DM	0,016	0,387	0,391						
GU	0,002	0,064	0,114	0,537					
PE	0,058	0,631	0,860	0,253	0,048				
PM	0,004	0,642	0,618	0,557	0,108	0,408			
PS	0,847	0,016	0,122	0,018	0,002	0,122	0,006		
SJ	0,056	0,849	0,988	0,369	0,081	0,846	0,597	0,097	
VR	0,398	0,083	0,286	0,046	0,006	0,285	0,033	0,587	0,238

Fonte: O autor (2023).

As análises de disparidade morfológica para fêmeas mostraram diferença significativa apenas entre os clados B e D (TABELA 26). Diferenças mais acentuadas foram encontradas para os machos, com o clado B apresentando diferenças significativas dos demais e o clado A sendo diferente do clado D. Essas diferenças podem ser melhor visualizadas também nas FIGURA 15 e Fonte: O autor (2023).

FIGURA 16 onde as análises canônicas utilizando os clados como grupos pré definidos deixou evidente as diferenças entre os clados, principalmente o clado B em relação aos demais.

TABELA 26 – Disparidade morfológica entre as fêmeas dos clados de *S. barbatus*. Valores significativos de p ($< 0,05$) estão destacados em negrito. os clados foram estabelecidos de acordo com a FIGURA 6.

Clados	A	B	C
B	0,344		
C	0,377	0,065	
D	0,170	0,024	0,661

Fonte: O autor (2023).

TABELA 27 – Disparidade morfológica entre os machos dos clados de *S. barbatus*. Valores significativos de p (< 0,05) estão destacados em negrito. os clados foram estabelecidos de acordo com a FIGURA. 6.

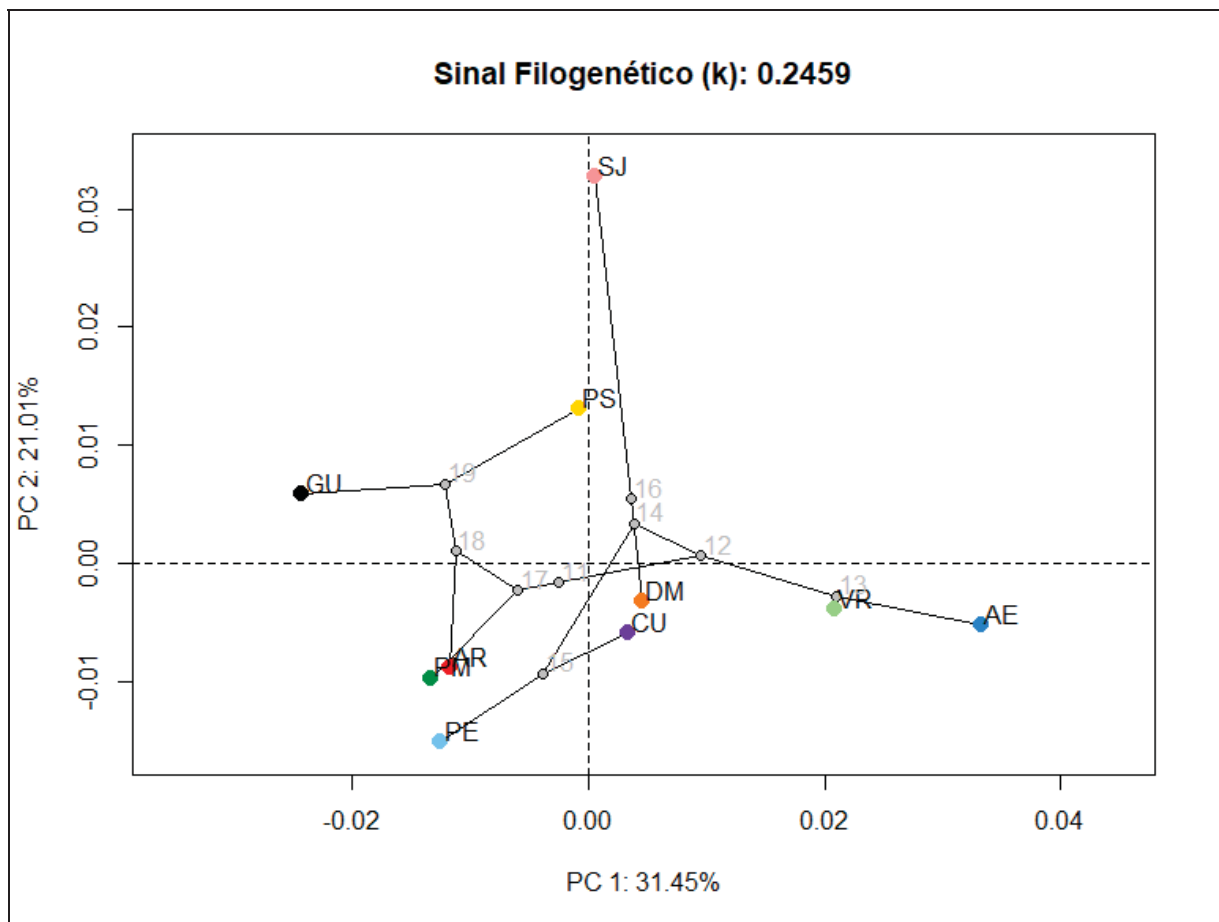
Clados	A	B	C
B	0,047		
C	0,218	0,03	
D	0,011	0,01	0,258

Fonte: O autor (2023).

A análise do sinal filogenético resultou em um valor k baixo para fêmeas (k 2459; p-valor 0,32) e machos (k 0,1733; p-valor 0,951) corroborando os demais resultados das análises morfométricas (FIGURA 17 e Fonte: O autor (2023)).

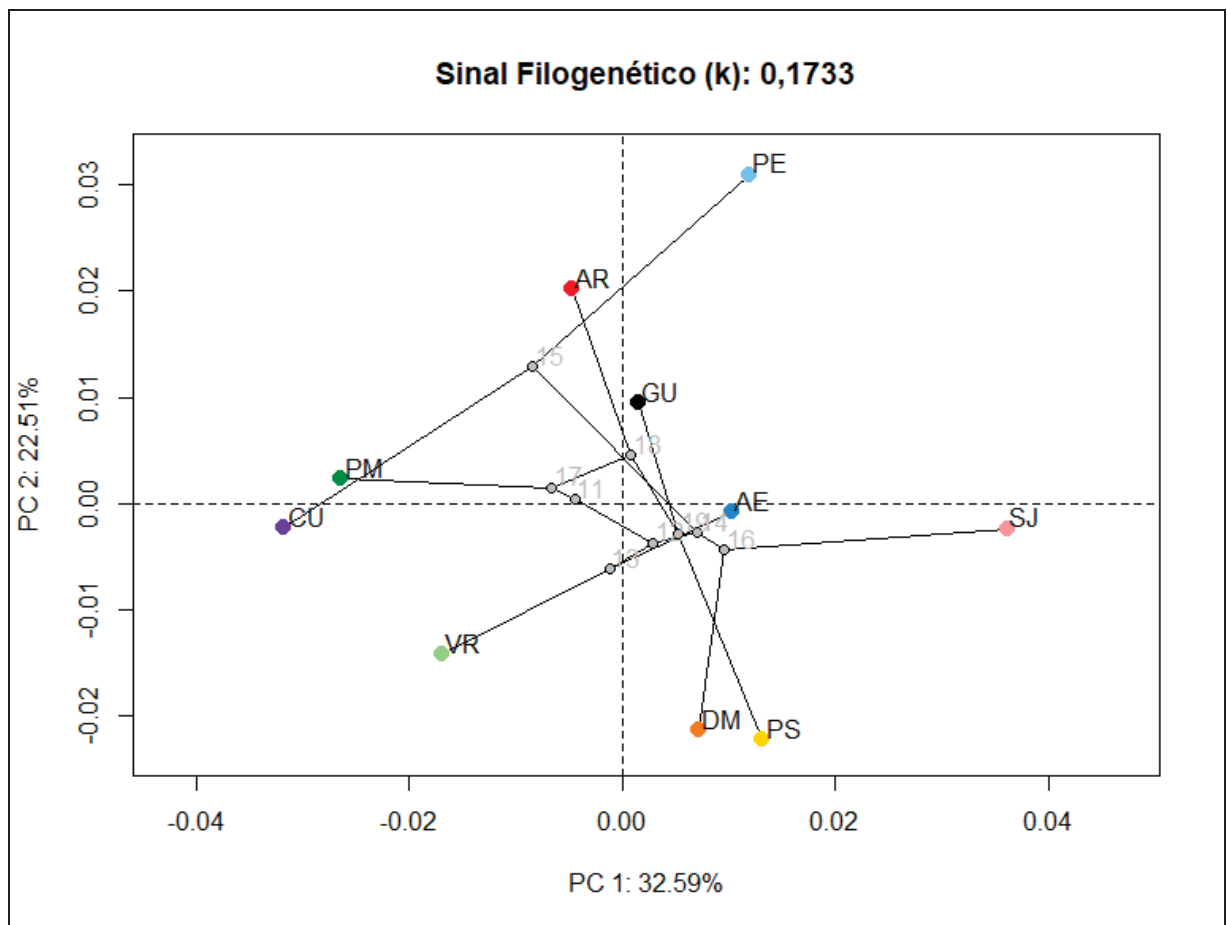
FIGURA 18), indicando que não existe um sinal filogenético associado a variação da forma entre as populações. O fraco sinal filogenético ficou mais evidente nos machos onde populações como CU e PM; DM e OS que são filogeneticamente distantes acabaram por ocupar o mesmo morfoespaço.

FIGURA 17 – Filomorfoespaço mostrando a não correlação entre as relações filogenéticas e variação da forma no morfoespaço para as fêmeas de *Scleromystax barbatus*. Cada ponto representa a forma média de uma população.



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 18 – Filomorfoespaço mostrando a não correlação entre as relações filogenéticas e variação da forma no morfoespaço para os machos de *Scleromystax barbatus*. Cada ponto representa a forma média de uma população.



Fonte: O autor (2023).

4 DISCUSSÃO

As análises populacionais realizadas com dados moleculares (valores de F_{st} , redes de haplótipos e KP2) indicam que as populações de *S. barbatus* estudadas se encontram estruturadas com pouco ou nenhum compartilhamento de haplótipos, indicando uma clara associação entre estrutura genética e geográfica.

Trabalhos anteriores com relações filogenéticas em que indivíduos de *S. barbatus* estavam envolvidos, foram focados nas relações entre membros de Callichthyidae e principalmente de Corydoradinae (ALEXANDROU *et al.*, 2011; BRITTO, 2003; GOSLINE, 1940; MARBURGER *et al.*, 2018; SHIMABUKURO-DIAS *et al.*, 2004; SPADELLA *et al.*, 2017) muitas vezes colocando os indivíduos utilizados nas análises como *Scleromystax* sp. (espécimes dentro da distribuição de *S. barbatus*) ou como *Scleromystax kronei* (que atualmente é sinônimo de *S. barbatus*). Como discutido abaixo, nossa conclusão é que *S. barbatus* representa um complexo de espécies.

Os resultados das análises de delimitação de espécies para as sequências dos genes citocromo b e ND4 sugeriram a existência de uma até dez unidades taxonômicas, de acordo com o método e o gene utilizado, sendo que o método ASAP estipulou uma quantidade menor de unidades taxonômicas e o PTP uma quantidade maior. A diferente quantidade de espécies geradas pelos métodos de delimitação, quando comparados entre si, é uma questão problemática, já reportada em outros estudos para peixes da região neotropical, principalmente quando utilizado genes de *locus* único (COSTA-SILVA *et al.*, 2015; DONIN; FERRER; CARVALHO, 2022; GARCIA-MELO *et al.*, 2019; SOUTO-SANTOS; JENNINGS; BUCKUP, 2022).

Os métodos de delimitação utilizam algoritmos que detectam lacunas nas árvores genéticas ou na variação de número de substituições de nucleotídeos para identificar a quantidade de supostas espécies (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013; PUIILLANDRE; BROUILLET; ACHAZ, 2021), sendo particularmente sensíveis à lacunas geradas artificialmente por amostras de espécies pertencentes a diferentes clados, ausência de estrutura populacional dentro das espécies e quando o tamanho da população e as taxas de especiação são altas (COSTA *et al.*, 2023; DELLICOUR; FLOT, 2015; FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013; LUO *et al.*, 2018). A dificuldade das metodologias empregadas para a delimitação em *S. barbatus* pode ter relação

com o isolamento e baixo compartilhamento de haplótipos entre as populações e também a quantidade de indivíduos de cada população utilizados nas análises, permitindo que as metodologias subestimassem ou superestimassem a quantidade de possíveis unidades taxonômicas.

Apesar das análises de delimitação de espécies sugerirem a existência de muitas unidades taxonômicas, o método GMYC e PTP para o gene citocromo b sugeriram a existência de três unidades taxonômicas, resultado semelhante ao observado nas outras análises moleculares e morfológicas. As árvores filogenéticas de cada gene recuperaram topologias semelhantes à árvore concatenada dos genes citocromo b, ND4 e RAG1 para as populações analisadas de *S. barbatus*, no entanto, apresentaram topologias distintas para as relações entre as demais espécies de *Scleromystax*. A árvore concatenada e a baseada no gene RAG1 apresentou resultados semelhantes aos obtidos por Shimabukuro-Dias *et al.* (2004), Alexandrou *et al.* (2011) e Marburger *et al.* (2018) utilizando também dados moleculares, com *S. prionotos* sendo o grupo mais próximo de *S. barbatus*, resultado diferente de Britto (2003), que utilizou dados morfométricos e recuperou *S. macropterus* como mais relacionado a *S. barbatus*. Os resultados das árvores filogenéticas recuperaram *S. barbatus* como um grupo monofilético, separando as populações em quatro linhagens evolutivas, com os clados C e D como grupos irmãos.

A diferenciação entre os clados também foi encontrada nas análises de morfometria geométrica que utilizaram os agrupamentos propostos nas análises moleculares como grupos pré-definidos, tanto para as análises canônicas como para as análises de disparidade morfológica. O clado B apresentou diferenças morfométricas mais evidentes, principalmente para os machos, indicando que essa linhagem pode estar passando por um processo de especiação influenciada pela seleção sexual. A seleção sexual atua sobre os atributos fenotípicos e as preferências de machos e fêmeas (CORNWALLIS; ULLER, 2010), sendo que a seleção de parceiros reprodutivos pode ocorrer com base em sinais químicos e/ou visuais (CANDOLIN, 2003). No caso de espécies dimórficas, como alguns representantes de *Scleromystax*, a comunicação visual pode apresentar grande importância para a seleção sexual, tendo em vista que além dos prolongamentos das nadadeiras dorsal e peitorais, os machos maduros também apresentam uma

densa área de curtos odontódeos nas regiões laterais da cabeça (BRITTO; LIMA, 2003).

A alta divergência genética também foi observada para outros peixes que apresentam uma grande distribuição em drenagens costeiras da Serra do Mar, como por exemplo os gêneros *Geophagus*, *Glandulocauda*, *Phalloceros* e *Schizolecis* (ARGOLO *et al.*, 2020; CAMELIER *et al.*, 2018; SOUTO-SANTOS; JENNINGS; BUCKUP, 2022; SOUZA *et al.*, 2018). Assim como os trabalhos citados anteriormente, nossos resultados indicam que *S. barbatus* representa um complexo de espécies e que as populações estudadas estão passando por um processo de isolamento geográfico que gradualmente pode levar ao acúmulo de mutações entre as linhagens e após longos períodos de tempo ocorrer um evento de especiação (FERGUSON, 2002). Esse processo de especiação pode ser chamado de “área cinza”, onde os limites entre as espécies e/ou linhagens evolutivas são difíceis de identificar, tornando os critérios para a identificação de novas espécies subjetivo (DE QUEIROZ, 2007).

Por se tratar de uma espécie endêmica de drenagens costeiras isoladas da Serra do Mar, a distribuição atual das linhagens de *S. barbatus* indica a influência da evolução do relevo e da hipótese das paleodrenagens na diversificação do grupo. As interconexões entre os canais fluviais (paleodrenagens) durante a retração do nível do mar no quaternário facilitaram o intercâmbio entre drenagens próximas que estavam isoladas durante os períodos de transgressão marinha (DIAS *et al.*, 2014; THOMAZ *et al.*, 2015). Conexões por paleodrenagens entre drenagens costeiras na Serra do Mar têm sido utilizadas para explicar a distribuição atual de muitas populações de peixes de bacias costeiras isoladas (LIMA *et al.*, 2016; SOUTO-SANTOS; JENNINGS; BUCKUP, 2022; THOMAZ; MALABARBA; KNOWLES, 2017).

Para a região que engloba a distribuição atual de *S. barbatus* foi hipotetizada a ocorrência de 18 paleodrenagens, que atingiram sua máxima exposição entre 19 e 26 mil anos atrás durante o Último Máximo Glacial do Pleistoceno, quando o mar recuou 125 m do nível atual (THOMAZ *et al.*, 2015; THOMAZ; KNOWLES, 2018). Nossos dados abrangem oito paleodrenagens propostas por Thomaz; Knowles (2018), onde o clado A engloba três paleodrenagens (Paraíba do Sul e adjacentes); o clado B a paleodrenagem de Ilha Bela; o clado C duas paleodrenagens (Ribeira de Iguape e adjacente); o clado D duas paleodrenagens (Itajaí e Paranaguá). Os cladogramas C e D estão inseridas em paleodrenagens vizinhas, o que explica a sua

relação próxima nas filogenias e o compartilhamento de alguns haplótipos. Os resultados da AMOVA também ressaltam a importância das paleodrenagens na estruturação atual de *S. barbatus* uma vez que os grupos estabelecidos (paleodrenagens) foram o que mais explicaram a variância dos dados.

Não foi encontrada nenhuma correlação entre o sinal filogenético e a morfometria geométrica, tanto para fêmeas como machos, sugerindo que a variação da forma do corpo em *S. barbatus* é distribuída aleatoriamente ao longo da filogenia (ARGOLO *et al.*, 2020), podendo indicar que as populações estão sofrendo pressões ambientais semelhantes, apesar da grande distribuição longitudinal. De fato, com exceção da população amostrada no rio Pernambuco (PE), que é um riacho típico da região de restinga (apresentando “cor de chá”, correnteza fraca e substrato predominante de areia e matéria vegetal), todos os demais corpos hídricos amostrados apresentam as mesmas características físicas. No entanto, nossas análises são limitadas e forma geral do corpo pode refletir atributos funcionais relacionado com natação, reprodução e alimentação, que podem ter um impacto maior na história evolutiva das populações (FEILICH; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, 2019).

A discordância entre os resultados utilizando diferentes métodos para delimitação de espécies é relativamente comum e nesse caso as inferências dos resultados devem ser as mais conservadoras possíveis (CARSTENS *et al.*, 2013). Considerando a premissa acima, as análises moleculares e de morfometria geométrica realizadas no presente estudo e o isolamento geográfico entre as linhagens (paleodrenagens). Nossos resultados indicam que *S. barbatus* representa um complexo de espécies, podendo ser dividido em quatro possíveis unidades taxonômicas.

O clado A é formado pelas populações mais ao norte da distribuição conhecida de *S. barbatus*, englobando a bacia do Paraíba do Sul e outros riachos litorâneos do estado do Rio de Janeiro (AR + GU + PS). A descrição original de *S. barbatus* foi feita com base em indivíduos coletados na cidade de Angra dos Reis – RJ (NIJSSEN; ISBRÜCKER, 1980), em um riacho próximo da população denominada como AR. Acreditamos que o nome *Scleromystax barbatus* deve ser aplicado para as populações das drenagens costeiras inseridas no estado do Rio de Janeiro e na bacia do Paraíba do Sul.

O clado B é formado por uma população coletada no litoral norte do estado de São Paulo (PM) e apresentou as maiores diferenciações para todas as análises

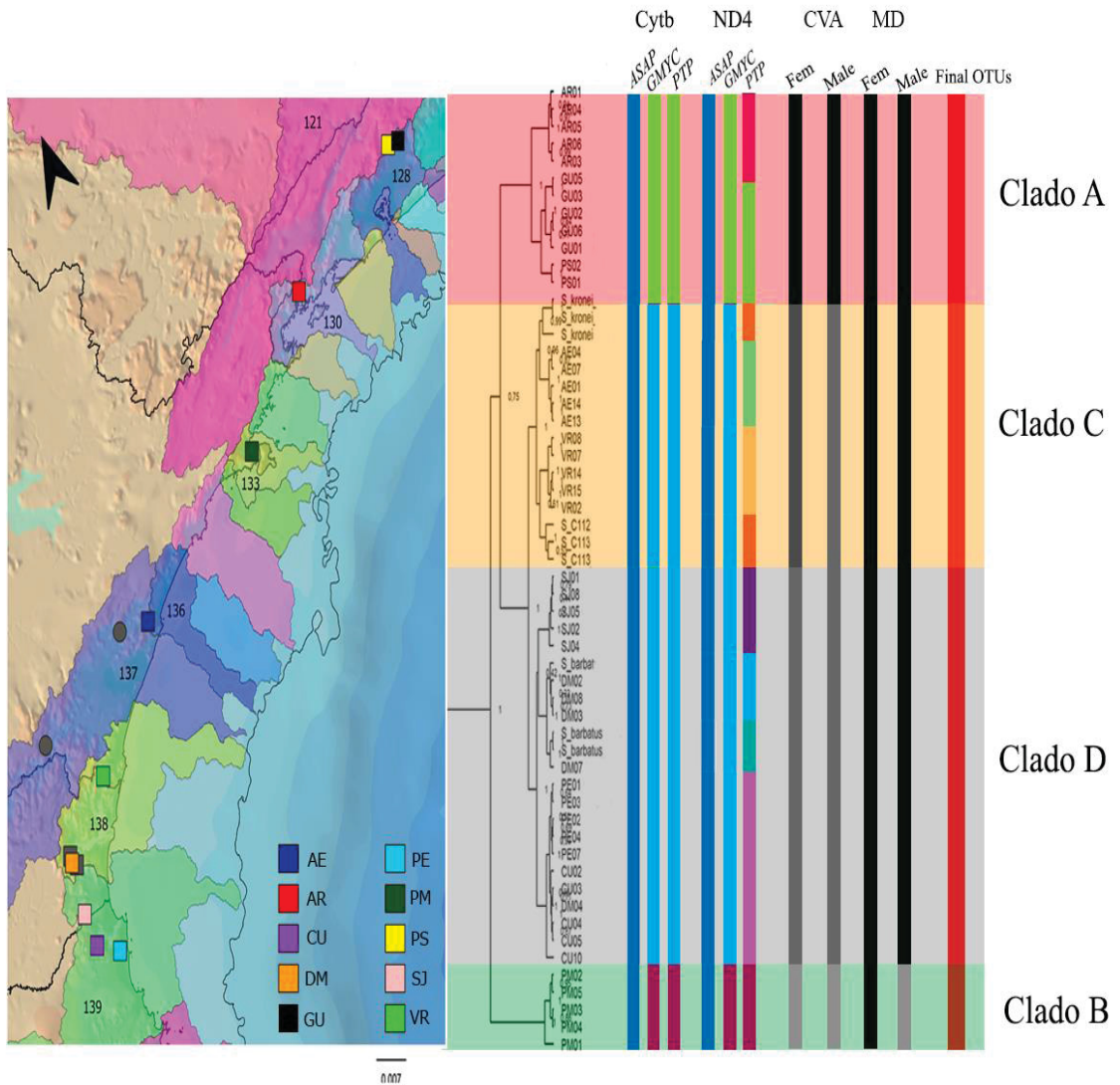
moleculares e morfométricas realizadas, sendo o primeiro clado a se diversificar das demais populações de *S. barbatus* segundo as filogenias obtidas, Estes resultados indicam que este táxon em questão é provavelmente uma espécie críptica dentro de *S. barbatus*, sendo necessário um olhar mais cuidadoso para sua correta diagnose.

O clado C é formado pelas espécies localizadas no Vale do Ribeira e outras bacias litorâneas próximas que incluem as populações AE e VR coletadas no presente estudo e as espécies *Scleromystax* sp. 'C112', *Scleromystax* sp. 'C113' e *S. kronei* que foram utilizadas nas análises de Alexandrou *et al.* (2011). *Corydoras kronei* foi descrito por Miranda (1907) baseado em indivíduos coletados no rio Iporanga, na região do Vale do Ribeira e posteriormente sinonizado com *Scleromystax barbatus* por Nijssen; Isbrücker (1980). Nossos resultados sugerem a ressurreição deste nome (sinônimo) para abrigar as populações do Vale do Ribeira e região.

O clado D é formado pelas populações localizadas em riachos litorâneos que desaguam nas baías da Babitonga, Guaratuba e Paranaguá inseridas nos estados do Paraná e Santa Catarina e também podem ser uma possível nova espécie para a ciência. Na FIGURA 19 consta o resumo dos resultados obtidos no presente estudo.

Nosso trabalho é o primeiro focado nas relações filogenéticas de *S. barbatus* e com dados envolvendo toda a distribuição conhecida da espécie, que ajudaram a entender melhor as relações entre as diferentes linhagens de uma espécie (gênero) restrita aos riachos de Mata Atlântica (BRITTO; FUKAKUSA; MALABARBA, 2016), fornecendo evidências importantes que podem auxiliar na compreensão evolutiva de outros táxons deste bioma.

FIGURA 19 – Consenso final dos resultados obtidos. a) imagem mostrando as drenagens costeiras do sul e sudeste do Brasil seguindo as paleodrenagens propostas por Thomaz *et al.*, 2018; os quadrados representam os locais das coletas e os números representam as paleodrenagens onde as populações estudadas estão inseridas. b) resultado da delimitação de espécie para cada gene utilizado (citocromo b, nd4 e rag1 e modelos utilizados ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning); GMYC (Generalized Model Yule Coalescence); PTP (Poison Tree Processes). c) resultados das análises de morfometria geométrica para machos e fêmeas de acordo com as análises canônicas (CVA) e disparidade morfológica (MD). no final consta nosso consenso final (final OTUs).



Fonte: O autor (2023).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. C. A generalized K statistic for estimating phylogenetic signal from shape and other high-dimensional multivariate data. **Systematic Biology**, v. 63, n. 5, p. 685–697, 2014.
- ADAMS, D. C.; OTÁROLA-CASTILLO, E. geomorph: an r package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 393–399, 1 abr. 2013.
- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the ‘revolution’. **Italian journal of zoology**, v. 71, n. 1, p. 5-16, 2009. DOI.10.1080/11250000409356545.
- AGAPOW, P.-M. *et al.* The impact of species concept on biodiversity studies. **The quarterly review of biology**, v. 79, n. 2, p. 161–179, 2004.
- ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, p. 27–53, 2 nov. 2020.
- ALEXANDROU, M. A. *et al.* Competition and phylogeny determine community structure in Müllerian co-mimics. **Nature**, v. 469, n. 7328, p. 84–88, 2011.
- ALMEIDA, J. S. *et al.* Chromosomal variation in the tropical armored catfish *Callichthys callichthys* (Siluriformes, Callichthyidae): implications for conservation and taxonomy in a species complex from a Brazilian hotspot. **Zebrafish**, v. 10, n. 4, p. 451–458, 2013.
- ARGOLO, L. A. *et al.* Unraveling the systematics and evolution of the ‘*Geophagus brasiliensis*’ (Cichliformes: Cichlidae) species complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 150, p. 106855, 2020.
- BARRETO, S. B. *et al.* Is *Nematocharax* (Actinopterygii, Characiformes) a monotypic fish genus? **Genome**, v. 59, n. 10, p. 851–865, 2016.
- BEAUMONT, A.; BOUDRY, P.; HOARE, K. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. **John Wiley & Sons**, 2010.
- BLEIDORN, C. **Phylogenomics: an introduction**. Springer, 2017.
- BONAPARTE, C. L. A new systematic arrangement of vertebrated animals. **R. Taylor**, 1841.
- BRITTO, M. R. Phylogeny of the subfamily Corydoradinae Hoedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 153, n. 1, p. 119–154, 2003.

BRITTO, M. R.; FUKAKUSA, C. K.; MALABARBA, L. R. New species of *Scleromystax* Günther, 1864 (Siluriformes: Callichthyidae) - extending the meridional distribution of genera endemic to the Atlantic Forest. **Neotropical Ichthyology**, v. 14, n. 3, p. 150158, 30 set. 2016.

BRITTO, M. R.; LIMA, F. C. T. *Corydoras tukano*, a new species of corydoradine catfish from the rio Tiquié, upper rio Negro basin, Brazil (Ostariophysi: Siluriformes: Callichthyidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 1, n. 2, p. 83–91, dez. 2003.

BRUFORD, M. W. *et al.* Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. **Molecular genetic analysis of populations: a practical approach.**, p. 225–269, 1992.

CAMELIER, P. *et al.* Molecular and morphological data of the freshwater fish *Glandulocauda melanopleura* (Characiformes: Characidae) provide evidences of river captures and local differentiation in the Brazilian Atlantic Forest. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0194247, 2018.

CANDOLIN, U. The use of multiple cues in mate choice. **Biological reviews**, v. 78, n. 4, p. 575–595, 2003.

CARSTENS, B. C. *et al.* How to fail at species delimitation. **Molecular ecology**, v. 22, n. 17, p. 4369–4383, 2013.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1657–1659, out. 2000.

CORNWALLIS, C. K.; ULLER, T. Towards an evolutionary ecology of sexual traits. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 3, p. 145–152, 2010.

COSTA-SILVA, G. J. *et al.* Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex Neotropical hyperdiverse group. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0135075, 2015.

COSTA, W. J. E. M. *et al.* Morpho-Molecular Discordance? Re-Approaching Systematics of *Cambeva* (Siluriformes: Trichomycteridae) from the Guaratuba-Babitonga-Itapocu Area, Southern Brazil. **Fishes**, v. 8, n. 2, p. 63, 2023.

DA ROCHA, R. H. *et al.* Integrated analysis reveals a new species of *Corydoras* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Callichthyidae) in the lower Iguassu River, Brazil. **Organisms Diversity and Evolution**, v. 22, n. 2, p. 457–474, 1 jun. 2022.

DE BRITO, V.; BUCKUP, P. A. The fish fauna of the upper Pirai drainage, a transposed mountain river system in southeastern, Brazil. **Check List**, v. 15, n. 1, p. 235, 2019.

DE PINNA, M. C. C. DE. Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes: Historical overview and synthesis of hypothesis. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, p. 279–330, 1998.

DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 879–886, 2007.

DELLICOUR, S.; FLOT, J.-F. Delimiting species-poor data sets using single molecular markers: a study of barcode gaps, haplowebs and GMYC. **Systematic Biology**, v. 64, n. 6, p. 900–908, 2015.

DIAS, M. S. *et al.* Global imprint of historical connectivity on freshwater fish biodiversity. **Ecology Letters**, v. 17, n. 9, p. 1130–1140, 1 set. 2014.

DONIN, L. M.; FERRER, J.; CARVALHO, T. P. Uncertainties and risks in delimiting species of *Cambeva* (Siluriformes: Trichomycteridae) with single-locus methods and geographically restricted data. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, 2022.

DRUMMOND, A. J. *et al.* Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular biology and evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Species by family/subfamily. **Catalog of fishes**, 2023.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p. 47–50, fev. 2007.

FEILICH, K. L.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. When Does Form Reflect Function? Acknowledging and Supporting Ecomorphological Assumptions. **Integrative and Comparative Biology**, v. 59, n. 2, p. 358–370, 2019.

FERGUSON, J. W. H. On the use of genetic divergence for identifying species. **Biological journal of the Linnean Society**, v. 75, n. 4, p. 509–516, 2002.

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

FORNEL, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. **PPG-Ecologia**, Erechim, v. 1, n. 1, p. 101–120, 2012.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2008.

FREDERICH, B.; ADRIAENS, D.; VANDEWALLE, P. Ontogenetic shape changes in Pomacentridae (Teleostei, Perciformes) and their relationships with feeding strategies: a geometric morphometric approach. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 95, n. 1, p. 92–105, 1 set. 2008.

FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. **Systematic biology**, v. 62, n. 5, p. 707–24, 2013.

- GARAVELLO, J. C. *et al.* Integrative taxonomy reveals a new species of Neotropical headstanding fish in genus *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 19, 2021.
- GARCEZ, D. K. *et al.* Phylogeography of the critically endangered neotropical annual fish, *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Aplocheilidae): genetic and morphometric evidence of a new species complex. **Environmental Biology of Fishes**, v. 101, n. 10, p. 1503–1515, 2018.
- GARCIA-MELO, J. E. *et al.* Species delimitation of neotropical Characins (Stevardiinae): Implications for taxonomy of complex groups. **PLoS One**, v. 14, n. 6, p. e0216786, 2019.
- GONÇALVES, C. DA S. *et al.* Identification key for fishes from coastal streams of the Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 17, 2017.
- GONÇALVES, C. DA S.; CESTARI, C. Uso de riacho costeiro da mata atlântica pelo limpa-fundo *Scleromystax barbatus* (Quoy & Gaimard, 1824). **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, n. 3, p. 115–120, 2013.
- GOSLINE, W. A. A revision of the Neotropical catfishes of the family Callichthyidae. **Stan. Lchth. Bull.**, v. 2, p. 1–29, 1940.
- HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1, p. S96-S99, 2003.
- HENRIQUES, J. M. *et al.* Use of DNA barcode in the identification of fish species from Ribeira de Iguape Basin and coastal rivers from São Paulo State (Brazil). **DNA Barcodes**, v. 3, n. 1, p. 118–128, 2015.
- IWASAKI, W. *et al.* MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 11, p. 2531–2540, nov. 2013.
- JIN, J. J. *et al.* GetOrganelle: A fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes. **Genome Biology**, v. 21, n. 1, p. 1–31, set. 2020.
- KENDALL, D. G. The diffusion of shape. **Advances in applied probability**, v. 9, n. 3, p. 428–430, 1977.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, p. 111–120, 1980.

- KLINGENBERG, C. P. Methods for studying allometry in geometric morphometrics: a comparison of performance. **Evolutionary Ecology**, v. 36, n. 4, p. 439–470, 1 ago. 2022.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–4, 2016.
- LEAVITT, S. *et al.* DNA barcode identification of lichen-forming fungal species in the *Rhizoplaca melanophthalma* species-complex (Lecanorales, Lecanoraceae), including five new species. **MycKeys**, v. 7, p. 1–22, 2013.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.
- LIMA, S. M. Q. *et al.* Effects of Pleistocene climatic and geomorphological changes on the population structure of the restricted-range catfish *Trichogenes longipinnis* (Siluriformes: Trichomycteridae). **Systematics and biodiversity**, v. 14, n. 2, p. 155–170, 2016.
- LUO, A. *et al.* Comparison of methods for molecular species delimitation across a range of speciation scenarios. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 830–846, 2018.
- MARBURGER, S. *et al.* Whole genome duplication and transposable element proliferation drive genome expansion in Corydoradinae catfishes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1872, 14 fev. 2018.
- MARIGUELA, T. C. *et al.* Historical biogeography and cryptic diversity in the Callichthyinae (Siluriformes, Callichthyidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 51, n. 4, p. 308–315, 2013.
- MASTROCHIRICO FILHO, V. A. *et al.* Genetic applications in the conservation of Neotropical freshwater fish. **Biological resources of water**, p. 249–284, 2018.
- MENEZES, N. A. *et al.* **Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2007.
- MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. **The Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. eds by P. W. Hochachka and T. P. Mommsen, Elsevier Press, New York, p. 1–38, 1993.
- MIRANDA RIBEIRO, A. Peixes do Iporanga—S. Paulo. Resultados de excursões do Sr. Ricardo Krone, membro correspondente do Museu Nacional do Rio de Janeiro. **Boletim Sociedade Nacional de Agricultura**, Rio de Janeiro [Lavoura], v. 11, p. 185–190, 1907.
- MITTEROECKER, P.; GUNZ, P. Advances in geometric morphometrics. **Evolutionary Biology**, v. 36, n. 2, p. 235–247, 2009.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. **Princípios de morfometria geométrica. In: Princípios de morfometria geométrica.** 1999. p. 189-189.

NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolution and phylogenetics. **Oxford University Press**, USA, 2000.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the World: Fifth Edition.** Fishes of the World: Fifth Edition, p. 1–707, 14 mar. 2016.

NIJSSEN, H.; ISBRÜCKER, I. J. H. A review of the genus *Corydoras* Lacépède, 1803 (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Bijdragen tot de Dierkunde**, v. 50, n. 1, p. 190–220, 1980.

OYAKAWA, O. T. *et al.* **Peixes de riachos da Mata Atlântica: nas unidades de conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo.** São Paulo: Neotropica, 2006.

PADIAL, J. M. *et al.* The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2010.

PADIAL, J. M.; DE LA RIVA, I. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 155, n. 1, p. 97–122, 2009.

PANG, X. *et al.* Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae. **Planta medica**, v. 76, n. 15, p. 1784–1786, 2010.

PAPAKOSTAS, S. *et al.* Integrative taxonomy recognizes evolutionary units despite widespread mitonuclear discordance: evidence from a rotifer cryptic species complex. **Systematic Biology**, v. 65, n. 3, p. 508–524, 2016.

PINHEIRO, P. C.; DALCIN, R. H.; BATISTA, T. T. A ictiofauna de áreas com interesse para a proteção ambiental de Joinville, Santa Catarina, Brasil. **Acta Biológica Catarinense**, v. 4, n. 3, 21 dez. 2017.

PONS, J. *et al.* Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic biology**, v. 55, n. 4, p. 595–609, 2006.

POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.

PULLANDRE, N.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ASAP: assemble species by automatic partitioning. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n. 2, p. 609–620, 2021.

RAMBAUT, A. *et al.* Tracer v1. 6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>, 2014.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e66213, 2013.

REIS, R. E. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 124, n. 2, p. 105–168, 1998.

REIS, R. E. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

ROHLF, F. J. **tpsUtil, file utility program, version 1.26**. Department of Ecology and Evolution, state university of new york at stony brook, 2004.

ROHLF, F. J. **tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.05**. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 2005.

SCHLAGER, S. Morpho and Rvcg – Shape Analysis in R: R-Packages for Geometric Morphometrics, Shape Analysis and Surface Manipulations. **Statistical Shape and Deformation Analysis: Methods. Implementation and Applications**, p. 217–256, 1 jan. 2017.

SEVILLA, R. G. *et al.* Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 5, p. 730–734, 1 set. 2007.

SHERRATT, E. **Quick Guide to Geomorph 3.0.2**. n. August, p. 145, 2016.

SHIMABUKURO-DIAS, C. K. *et al.* Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 152–163, 1 jul. 2004.

SIDLAUSKAS, B. L.; MOL, J. H.; VARI, R. P. Dealing with allometry in linear and geometric morphometrics: a taxonomic case study in the *Leporinus cylindricus* group (Characiformes: Anostomidae) with description of a new species from Suriname. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 162, n. 1, p. 103–130, 1 maio 2011.

SITES JR, J. W.; MARSHALL, J. C. Operational criteria for delimiting species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, p. 199–227, 2004.

SOUTO-SANTOS, I. C. A.; JENNINGS, W. B.; BUCKUP, P. A. Testing palaeodrainage hypotheses in south-eastern Brazil: phylogeography of the sinistral livebearer fish of the genus *Phalloceros* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 2022.

SOUZA, C. S. *et al.* Genetic and morphological analyses demonstrate that *Schizolecis guntheri* (Siluriformes: Loricariidae) is likely to be a species complex. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 69, 2018.

SPADELLA, M. A. *et al.* Variation in male reproductive system characters in Corydoradinae (Loricarioidei: Callichthyidae) reflects the occurrence of different lineages in this subfamily. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, 2017.

TALAVERA, G.; DINCĂ, V.; VILA, R. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 12, p. 1101–1110, 2013.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.

TAN, D. S. H. *et al.* From 'cryptic species' to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae: Diptera). **Zoologica Scripta**, v. 39, n. 1, p. 51–61, 2010.

TEAM, R. C. R. **A language and environment for statistical computing [Computer software manual]**. Vienna, Austria., 2019.

THOMAZ, A. T. *et al.* Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: Study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, v. 42, n. 12, p. 2389–2401, 2015.

THOMAZ, A. T.; KNOWLES, L. L. Flowing into the unknown: inferred paleodrainages for studying the ichthyofauna of Brazilian coastal rivers. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, 2018.

THOMAZ, A. T.; MALABARBA, L. R.; KNOWLES, L. L. Genomic signatures of paleodrainages in a freshwater fish along the southeastern coast of Brazil: genetic structure reflects past riverine properties. **Heredity**, v. 119, n. 4, p. 287–294, 2017.

TRESBACH, R. H. *et al.* DNA barcoding: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 2, p. 77–81, 2015.

TSCHÁ, M. K. *et al.* Past connection and isolation of catchments: The sea-level changes affect the distribution and genetic variability of coastal freshwater fishes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 190, p. 31–39, 2017.

WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays**, v. 29, n. 2, p. 188–197, 2007.

WICK, R. R. *et al.* Bandage: Interactive visualization of de novo genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 31, n. 20, p. 3350–3352, 2015.

WOLSTENHOLME, D. R. Genetic novelties in mitochondrial genomes of multicellular animals. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 2, n. 6, p. 918–925, 1992.

ZACHOS, F. E. (New) Species concepts, species delimitation and the inherent limitations of taxonomy. **Journal of genetics**, v. 97, p. 811–815, 2018.

ZHANG, J. *et al.* A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869–2876, 2013.

CAPÍTULO 3 DISCRIMINATING *Scleromystax barbatus* (SILURIFORMES: CALLICHTHYIDAE) POPULATIONS FROM ATLANTIC RAINFOREST RIVERS EMPLOYING OTOLITH SHAPE

(Capítulo submetido a Neotropical Ichthyology)

Roger Henrique Dalcin¹ and Vinicius Abilhoa^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná. Avenida Cel. Francisco H. dos Santos, S/N, Jardim das Américas, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil, roger_dalcin@hotmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-7896-7404> (corresponding author)

²Museu de História Natural Capão da Imbuia, MAPCF/PMC, Rua Prof. Nivaldo Braga, nº 1369, CEP 82810-080, Curitiba, PR, Brazil. vinicius.abilhoa@gmail.com, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-9463-0200>

RESUMO

Este estudo avaliou a forma do otólito *lapillus* em oito populações isoladas de *Scleromystax barbatus* ao longo de sua distribuição natural em riachos litorâneos da Floresta Atlântica utilizando os descritores de Fourier e Wavelets. O otólito utricular de *S. barbatus* apresenta forma ovoide, com o *gibbus maculae* ocupando quase a totalidade da parte ventral, semelhante a outros otólitos de Callichthyidae. Foram encontradas diferenças nas formas dos otólitos entre todas populações estudadas, com exceção das populações provenientes do limite sul da distribuição da espécie. Os resultados indicam que análises da forma dos otólitos são ferramentas úteis para análises de variações fenotípicas e identificação de populações e espécies. No entanto, estudos adicionais são necessários para investigar a influência de efeitos genéticos e suas interações com o meio para entender melhor como esses fatores podem afetar a forma dos otólitos entre as diferentes populações de *S. barbatus*.

Palavras-chave: Corydoradinae; coridoras; estrutura populacional; morfologia; neotropical.

ABSTRACT

This study assessed the *lapillus* otolith shapes of eight isolated *Scleromystax barbatus* populations along this species natural distribution throughout coastal Atlantic Rainforest streams employing Fourier and Wavelet descriptors. The utricular otoliths in *S. barbatus* are ovoid, with the *gibbus maculae* occupying almost all the

ventral portion, similar to other Callichthyidae otoliths. Otolith shape differences were noted among all studied populations, except for those sampled at the southern limit of the species distribution. The results indicate that otolith shape analyses are useful in analyzing phenotypic variations and identifying populations and species. However, additional studies are required to investigate the influence of genetic effects and their environmental interactions to better understand how these factors can affect otolith shape among different *S. barbatus* populations.

Key words: armored-catfish; Corydoradinae; morphology; neotropical; population structure

1 INTRODUCTION

The Brazilian Atlantic Rainforest biome is one of the most biologically rich, albeit threatened, biodiversity hotspot (MYERS *et al.*, 2000). Despite their wide geographical range throughout the Brazilian coast at almost 30° of latitude, after five centuries of human occupation less than 7% of original forests remain, now comprising only fragments surrounded by open-habitat matrices, such as agricultural and urban landscapes (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Atlantic Rainforest rivers and streams harbor a high taxonomic and functional fish fauna diversity (ABILHOA *et al.*, 2011). Many fish species within this biome display restricted distributions, associated to the high number of independent hydrological drainages that arise in high altitudes and flow towards the Atlantic Ocean (MENEZES *et al.*, 2007). Both geological and ecological conditions have influenced the unique diversification patterns, genetic population structuring and high number of endemic fish species noted in this region (THOMAZ *et al.*, 2015; TORRES; RIBEIRO, 2009).

Due to the isolating effect of mountain ranges on the geographic distribution of fishes that occur coastal Atlantic Rainforest rivers, several dispersal-vicariance mechanisms and hypotheses based on headwater stream capture and isolation/connection due to marine transgressions and regressions have been proposed (RIBEIRO, 2006; ROXO *et al.*, 2014; THOMAZ; KNOWLES, 2018) to explain species exclusiveness and distribution and connectivity patterns, indicating that the Atlantic Rainforest fish diversity involves river connection-disconnection processes at different space and time scales.

Species belonging to the *Scleromystax* Günther, 1864 genus (Siluriformes, Callichthyidae, Corydoradinae), popularly known as banded coridoras, are geographically widespread throughout coastal Atlantic Rainforest rivers (BRITTO, 2003; BRITTO; FUKAKUSA; MALABARBA, 2016). This monophyletic genus includes six species of small armored-catfish, namely *S. barbatus* (Quoy & Gaimard, 1824), *S. macropterus* (Regan, 1913), *S. prionotos* (Nijssen & Isbrücker, 1980), *S. salmactis* Britto & Reis, 2005, *S. reisi* Britto, Fukakusa & Malabarba, 2016 and *S. virgulatus* (Nijssen & Isbrücker 1980). The banded coridoras *S. barbatus* exhibits a relatively broad distribution area through coastal rivers basins off southern and southeastern Brazil, from the Paraíba do Sul River basin to the Itapocu River basin (MENEZES *et*

al., 2007). This species differs from its congeners by the presence of dark brown blotches, often coalesced, extending from almost the entire dorsolateral body plates towards the base of caudal fin, displaying irregular small dark brown blotches distributed over the head (OYAKAWA *et al.*, 2006). It is mostly found in small groups inhabiting shallow stream portions, feeding on benthic invertebrates while moving and probing the substrate (ARANHA; TAKEUTI; YOSHIMURA, 1998; GONÇALVES; CESTARI, 2013). Molecular genetic variations within *S. barbatus* populations in southern Brazil indicate that this species is an interesting model for phylogeographic studies (TSCHÁ *et al.*, 2017).

Studies concerning evolutionary and biogeographic history effects on Atlantic Rainforest freshwater fish distributions have revealed that many widely distributed species display high genetic divergences (SOUZA *et al.*, 2018; THOMAZ; MALABARBA; KNOWLES, 2017; TORRES; RIBEIRO, 2009), often with low morphological variations between geographically isolated populations, indicating that the ichthyofauna in this region is much more diverse than previously thought. Therefore, an ongoing need to explore additional methodological approaches to address issues such as species identification, speciation, geographic variation, structured genetic variation, and phylogeny, is paramount (GARAVELLO *et al.*, 2021; IBÁÑEZ *et al.*, 2022; PADIAL *et al.*, 2010).

Otoliths, commonly known as earstones, are calcareous structures positioned in the inner ear of teleost fish, in close association with the sensorial macula, whose main functions comprise hearing and gravity perception (PLATT; POPPER, 1981). Three pairs of otoliths are present, the *sagittae*, *lapillus*, and *asteriscus*, which in many cases, display a species-specific morphology (RODRÍGUEZ; MENDOZA, 2006). The saccular otolith, *sagitta*, is largest in most teleosts, and the lagenar otolith, *asteriscus*, is largest in most ostariophysians, while the utricular otolith, *lapillus*, is usually the most conspicuous otolith in Siluriformes (ASSIS, 2003; PLATT; POPPER, 1981). Although otolith appearance and shape indicate high levels of morphological differentiation between species (*e.g.* DENG *et al.*, 2013; POPPER *et al.*, 2005; VOLPEDO *et al.*, 2015), intraspecific variations within species may occur according to sex (*e.g.* BOSE *et al.*, 2017; MACIEL *et al.*, 2019), growth (*e.g.* BOSE *et al.*, 2018; LOMBARTE, CASTELLÓN, 1991), geography (*e.g.* STRANSKY *et al.*, 2008; TREINEN-CRESPO *et al.*, 2012) and environmental

factors (e.g. LOMBARTE; LLEONART, 1993; SCHULZ-MIRBACH; HESS; PLATH, 2011).

Considering that otolith morphological, morphometric and shape analyses have increasingly been applied as tools in stock assessments (HÜSSY *et al.*, 2016; MORAWICKI; SOLIMANO; VOLPEDO, 2022; PAUL; OEBERST; HAMMER, 2013), ecological studies (SCHULZ-MIRBACH; HESS; PLATH, 2011; TUSET *et al.*, 2016) and species discrimination (DENG; WAGNER; POPPER, 2013; MERELES *et al.*, 2021; POPPER; RAMCHARITAR; CAMPANA, 2005), evaluating intra- and inter-specific variability between different populations, the specific aim of our study was to provide an in-depth appraisal of the value of a *lapillus* otolith shape analysis for the identification of divergences among isolated *Scleromystax barbatus* populations from coastal Atlantic Rainforest rivers.

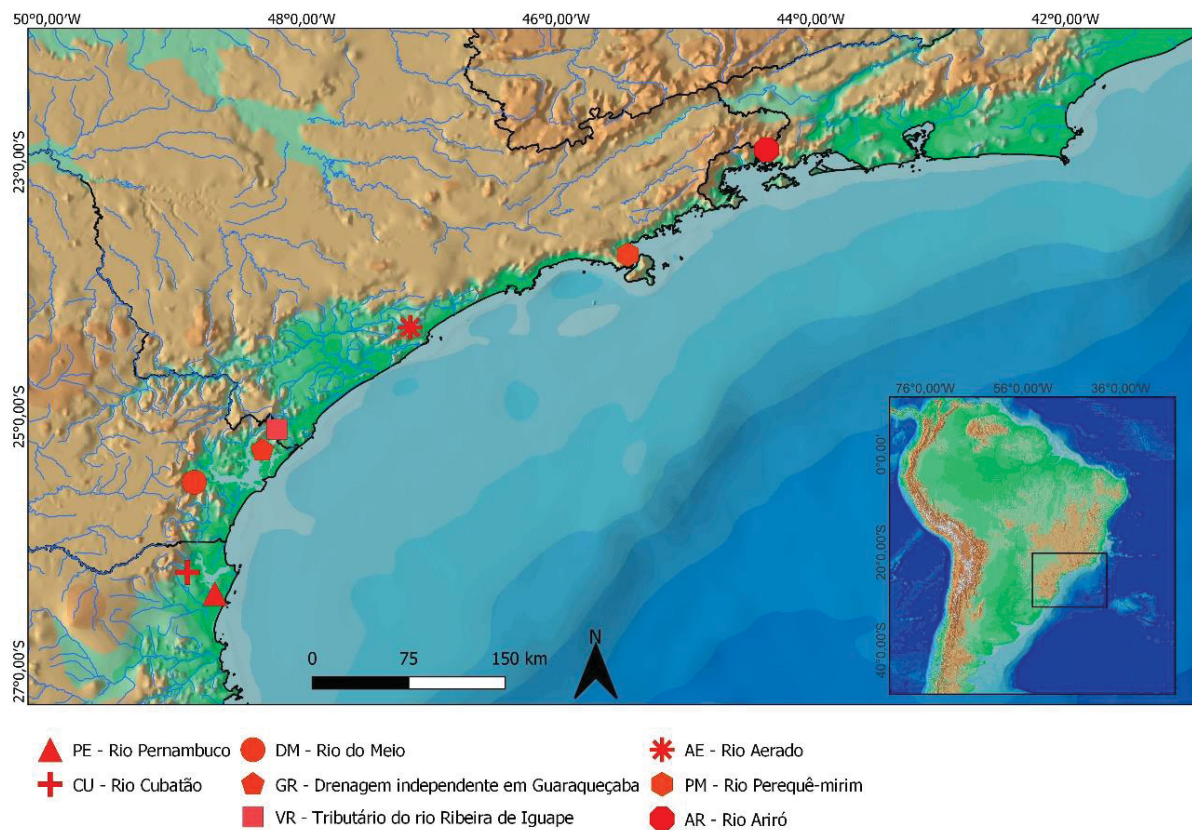
2 MATERIAL AND METHODS

2.1 STUDY AREA

Scleromystax barbatus individuals were sampled from eight coastal rivers that drain directly to the Atlantic Ocean in southern and southeastern Atlantic Rainforest biome (FIGURE 20). Individuals from eight *S. barbatus* populations were sampled along the species known distribution from clear-water streams between 2019 and 2021 employing electrofishing and seine nets. Voucher specimens were deposited in the fish collection of the Capão da Imbuia Natural History Museum (MHNCI) (

TABLE 28 – *Scleromystax barbatus* population sampling sites in coastal atlantic rainforest rivers, number of individuals (N) and voucher numbers.).

FIGURE 20 – Geographic location of the *Scleromystax barbatus* population sampling points in coastal atlantic rainforest rivers applied herein.



Fonte: O autor (2023).

TABLE 28 – *Scleromystax barbatus* population sampling sites in coastal atlantic rainforest rivers, number of individuals (N) and voucher numbers.

Code	Municipality/State	Hydrographic system	Location	N	Voucher
AR	Angra dos Reis - RJ	Ariró	567045/ 7467176	13	MHNCI12735
PM	Caraguatatuba-SP	Pereque-Mirim	455433/ 7376043	12	MHNCI12827
AE	Itariri-SP	Aerado	282136/ 7311146	13	MHNCI12734
VR	Jacupiranga-SP	Small tributary	782934/ 7221121	12	MHNCI12828
GR	Guaraqueçaba-PR	Guaraqueçaba	770950/ 7203143	12	MHNCI12829
DM	Paranaguá-PR	Do Meio	7176385/ 716803	12	MHNCI12830
CU	Joinville-SC	Cubatão Norte	710086/ 7097948	12	MHNCI12831
PE	Barra do Sul-SC	Pernambuco	731229/ 7079181	10	MHNCI12736

Fonte: O autor (2023).

2.2 DATA COLLECTION

Total lengths (TL; mm) were determined and otoliths were extracted from each specimen, washed, and stored dry before subsequent analyses. To reduce the effect of ontogenetic otolith changes, analyses were performed for adult fish ranging from 4.0 to 8.0 cm TL. For the morphological analyses, the left *lapillus* otoliths of 96 *S. barbatus* specimens were placed with the macular hump facing up (ventral surface), and with the anterior extreme pointing left. Two-dimensional digital images were recorded using a Leica® M205 C stereomicroscope, coupled with a digital camera MC170 HD (Leica®) employing the LAS 4.8.0 software (Leica®) using reflected light with a dark background.

2.3 DATA ANALYSES

The *lapillus* otoliths were described according to Assis (2005) and Sánchez, Martínez (2017). Otolith image analyses were performed following Libungan, Pálsson (2015) using the R shapeR package (R Development Core Team, 2021). Otolith outlines and shape coefficients were assessed employing normalized elliptic Fourier transform and Wavelet functions.

The Elliptic Fourier analysis provides information concerning overall differences in otolith shape, describing and characterizing outlines in a quantifiable manner (LESTREL, 1997). The method fitted a number of harmonic functions to capture crenulations and lobes on the otolith edges (TRACEY; LYLE; DUHAMEL,

2006). The Wavelet method is useful for detecting shape differences at specific regions, which may be located at a given angle on the otolith outline (LIBUNGAN; PÁLSSON, 2015). The Wavelet method fits a series of approximating functions within restricted domains to quantify the outline shapes (GRAPS, 1995), and has been proven an adequate method to detect inter- and intraspecific differences (*TUSET et al.*, 2021). Prior to the shape analyses, the outlines of each image were smoothed to remove the high frequency of pixel noise around the otolith contour using the smoothout function with 100 iterations.

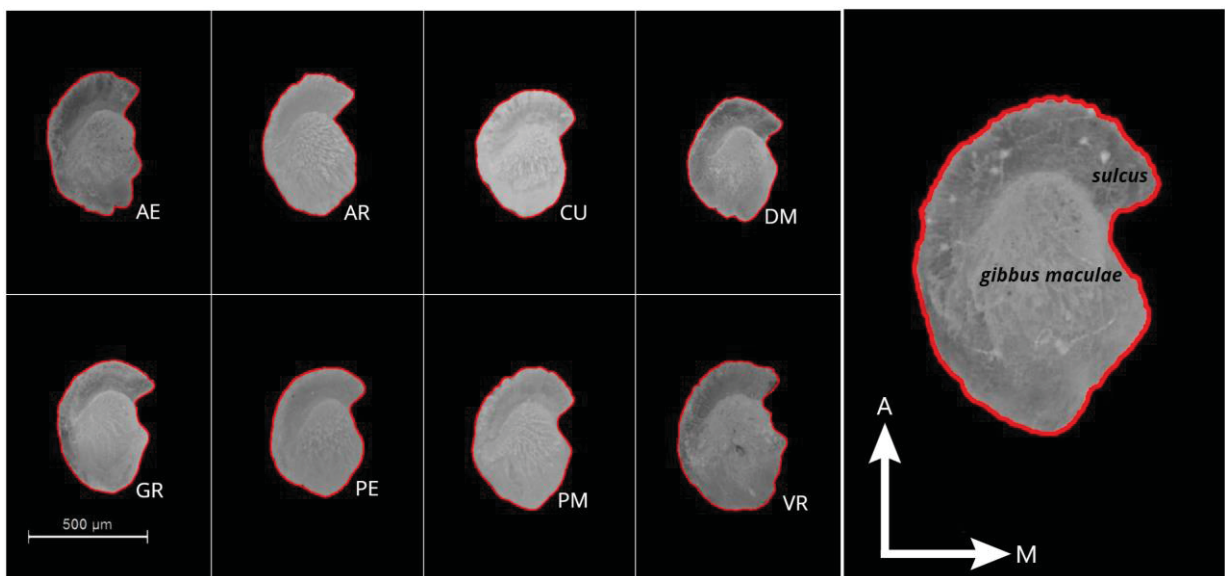
The Fourier/Wavelet coefficients were standardized by fish length (LIBUNGAN; PÁLSSON, 2015) and each *S. barbatus* population was reconstructed using the mean Fourier/Wavelet coefficients and plotted using the 'plotFourierShape' and 'plotWaveletShape' functions, respectively (LIBUNGAN; PÁLSSON, 2015). Prior to the analysis concerning inter-population differences, five Fourier and Wavelet coefficients that did not meet normality (Shapiro–Wilk's tests) and homoscedasticity (Levene's tests) assumptions were removed, totaling 40 Fourier and 50 Wavelet coefficients.

The shape variations among the groups were compared by a Canonical Analysis of Principal coordinates (CAP) applied to the Fourier/Wavelet coefficients using the capscale function available in the vegan package (OKSANEN *et al.*, 2013). The ordination of the population's averages along the first two canonical axes was evaluated graphically with shape descriptors. An ANOVA-like permutation test for the CAP was applied to assess the significance of constraints employing 1000 permutations. A minimum of 1 % was adopted as the significance level. All statistical analyses were performed in the R environment (R Development Core Team, 2021).

3 RESULTS

Scleromystax barbatus lapillus otoliths display an elongation in the superior-inferior axis, with uneven wavy bottom edges, while the *gibbus maculae* is large, prominent, occupying much of the surface of the otolith and the sulcus is short, wide and contours the inner *gibbus maculae* region (FIGURE 21).

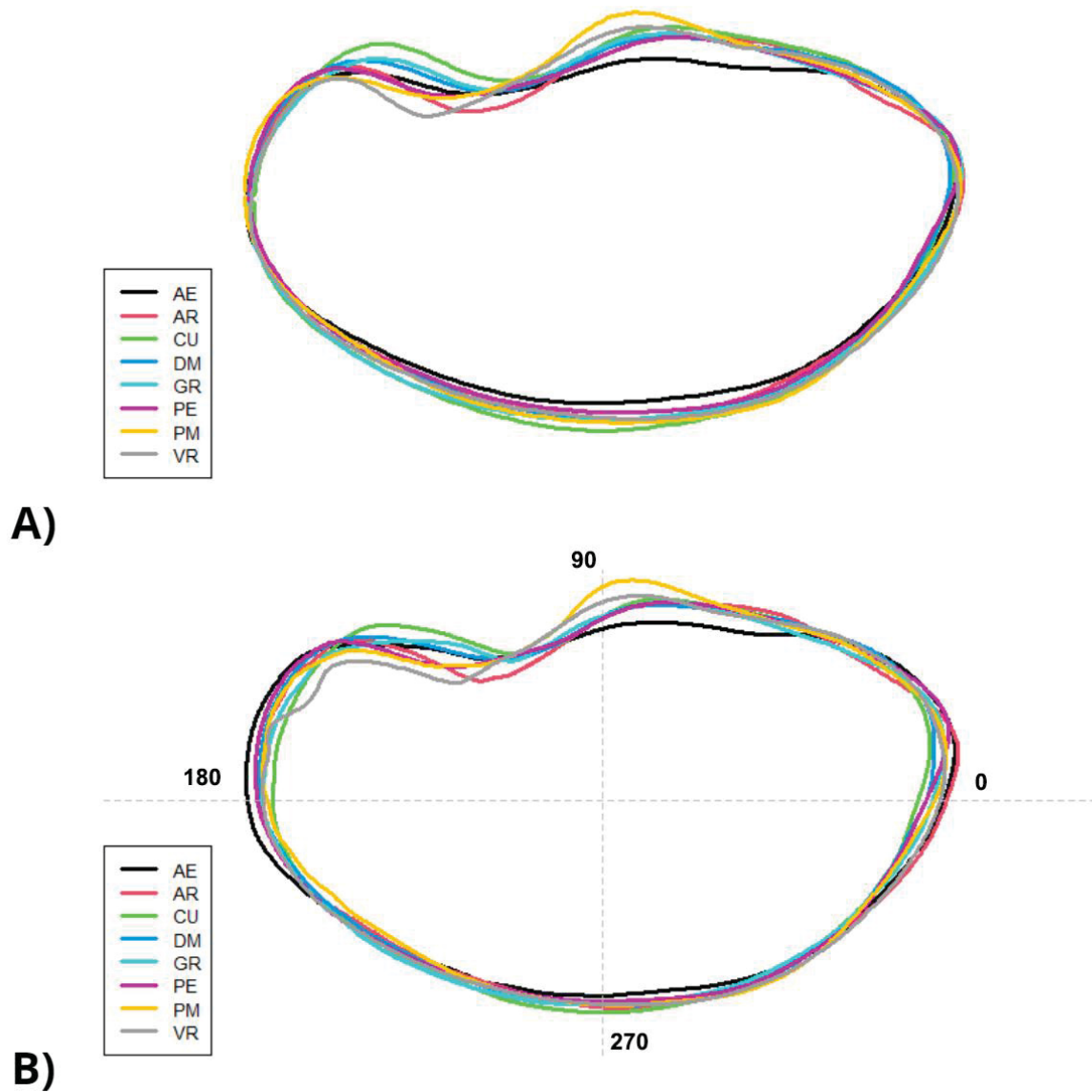
FIGURE 21 – Ventral view of the left lapillus in otoliths sampled from *Scleromystax barbatus* populations from coastal atlantic rainforest rivers. abbreviations are listed TABLE 1. a (anterior), m (medial).



Fonte: O autor (2023).

The Fourier and Wavelet reconstructions indicated differences among the mean otolith outlines for all groups (FIGURE 22). The highest variation was observed for the extremum anterior and medial regions and the more posterior region of the sulcus, with a more pronounced difference noted for AE in all these locations. Conversely, high overlaps in the lateral and posterior *sulcus* regions and in the anterior and medial *gibbus maculae* region were observed.

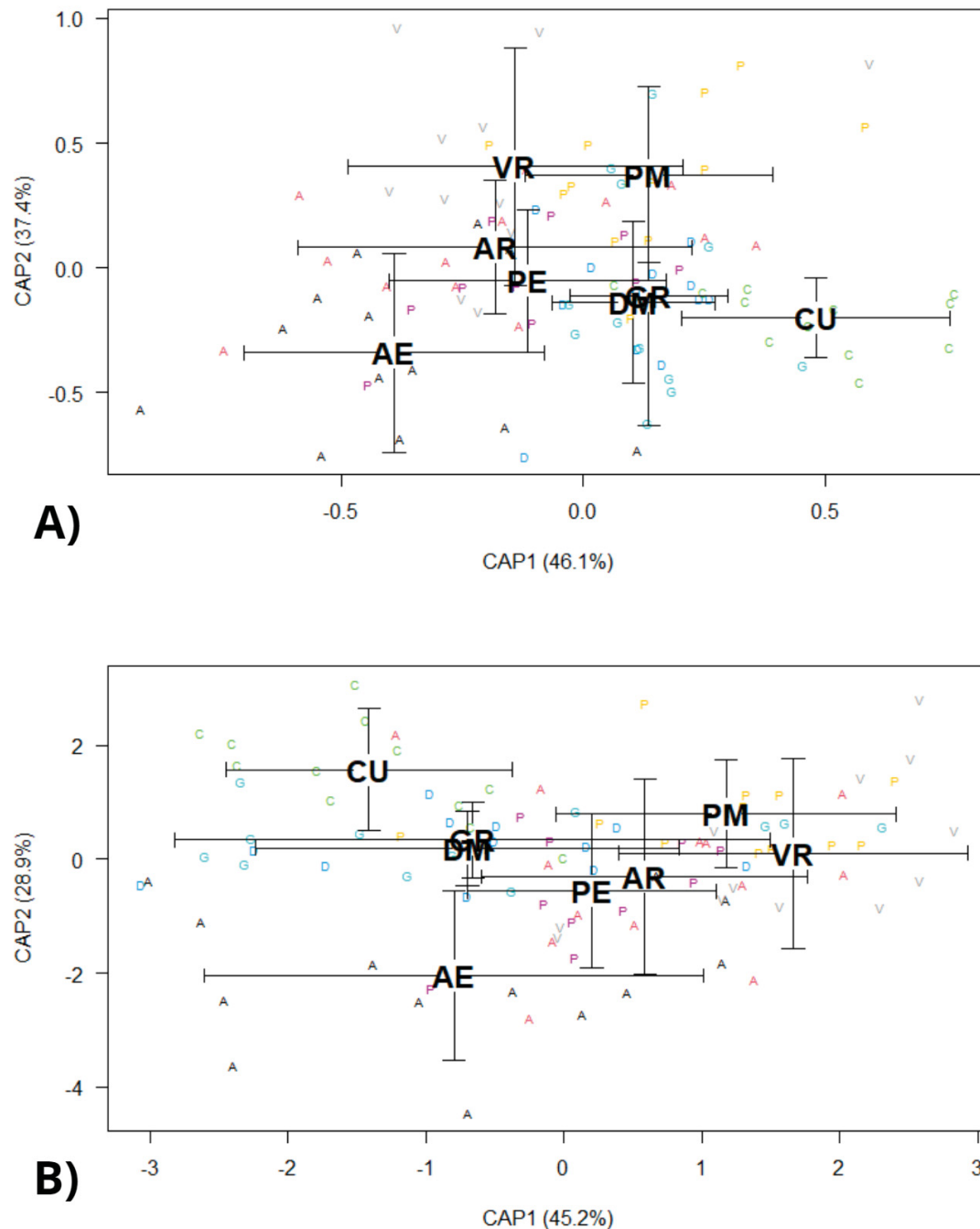
FIGURE 22 – Mean otolith shape based on the fourier (a) and wavelet (b) reconstructions for each *Scleromystax barbatus* population from coastal atlantic rainforest rivers. Degrees (°) represent angles in polar coordinates concerning the wavelet analysis.



Fonte: O autor (2023).

The CAP assessments indicated that otolith shape was not homogeneous among populations for both coefficients (ANOVA-like, $P < 0.001$). The first two principal coordinates axes explained 83.5% of the total Fourier coefficient and 74.1% of the Wavelet coefficient variation (FIGURE 23).

FIGURE 23 – Otolith shapes of *Scleromystax barbatus* populations from coastal atlantic rainforest rivers employing a canonical analysis of principal coordinates applied to fourier (a) and wavelet (b) coefficients. Bold letters represent the mean canonical coordinates surrounding the standard error for each population.



Fonte: O autor (2023).

An ANOVA-like permutation test for the Fourier/Wavelet coefficients indicated significant differences among all paired sampled groups ($P < 0.05$) except

between DM vs GR for Fourier coefficients (TABLE 29) and CU vs GR; DM vs GR for Wavelet coefficients (TABLE 30).

TABLE 29 – Analysis of variance (anova-like) permutation test for fourier coefficients concerning otolith shape among *Scleromystax barbatus* populations from coastal atlantic rainforest rivers.

	AE	AR	CU	DM	GR	PE	PM
AR	<0.001						
CU	<0.001	<0.001					
DM	<0.001	<0.002	<0.001				
GR	<0.001	<0.003	<0.002	0.085			
PE	<0.005	<0.038	<0.001	<.0.012	<0.021		
PM	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.002	<0.001	
VR	<0.001	<0.006	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.004

Fonte: O autor (2023).

TABLE 30 – Analysis of variance (anova-like) permutation test for wavelet coefficients concerning otolith shape among *Scleromystax barbatus* populations from coastal atlantic rainforest rivers.

	AE	AR	CU	DM	GR	PE	PM
AR	<0.001						
CU	<0.001	<0.001					
DM	<0.001	<0.001	<0.014				
GR	<0,004	<0.001	0.063	0.238			
PE	<0,006	<0.003	<0.001	<0.021	<0.03		
PM	<0.001	<0.002	<0.001	<0.002	<0.003	<0.002	
VR	<0.001	<0.004	<0.001	<0.001	<0.003	<0.006	<0.005

Fonte: O autor (2023).

4 DISCUSSION

The morphologies of the major *Scleromystax barbatus lapillus* otolith structures are very characteristic and can be effectively assign to the general morphology of the lapillus otolith of most armored catfishes belonging to the Callichthyidae family (VOLPEDO; FUCHS, 2010). Although it is not possible to establish a morphological pattern for the otoliths of Siluriformes fish from the Neotropical region (BREMM; SCHULZ, 2014; CUTRIM; BATISTA, 2005; FUCHS; VOLPEDO, 2009; SÁNCHEZ; MARTÍNEZ, 2017; VOLPEDO; FUCHS, 2010), due to the great diversity of this monophyletic group (MALABARBA; MALABARBA, 2019) and phenotypic plasticity (ALEXANDROU *et al.*, 2011; LUJAN; ARMBRUSTER, 2012), the *lapillus* otoliths analyzed in the present study correspond to the non-clupeiform type proposed by Assis (2005) for teleosts. Furthermore, the prominent and large *gibbus maculae* and the elongation noted in its posterior-anterior axis correspond to the ovoid model proposed by Sánchez, Martínez (2017) for the Loricariidae *lapillus*.

Among the three pairs of otoliths, the *lapillus* is the one that presents the most regular edge shape and the most homogeneous structure constitution, indicating that geometric morphometry and shape indices are less efficient, due to the difficulty in finding comparable (homologous) structures (ADAMS; ROHLF; SLICE, 2009; ASSIS, 2005; TUSET *et al.*, 2021). For this reason, the use of contour analyses is more indicated for this type of otolith, as these methodologies are more efficient to capture all small otolith silhouette variations (MERELES *et al.*, 2021; TUSET *et al.*, 2021). In fact, Fourier and Wavelet analyzes were proven efficient in identifying different *S. barbatus* populations, with Fourier descriptors proving slightly more sensitive to capture these variations through canonical and ANOVA analyses. Similar results have been reported by other studies for *lapillus* using shape analyses (D'IGLIO *et al.*, 2023; PAVLOV, 2022; QIAO *et al.*, 2022).

Reconstruction of otolith shapes employing Fourier and Wavelet analyses indicates that changes in *S. barbatus* otolith shapes occur mainly in the anterior-posterior direction and at the edges of the *sulcus* and *gibbus maculae* regions. The otoliths of *S. barbatus* populations located further north of the species distribution are more elongated in the anterior-superior direction and present larger *sulcus* and

gibbus maculae regions and more heterogeneous borders when compared to populations with more southerly distributions.

Otolith shapes have been proven an efficient tool to identify marine and estuarine fish populations (ADELIR-ALVES *et al.*, 2018; BOSE; ADRAGNA; BALSHINE, 2017; BOUDINAR *et al.*, 2016; CARDINALE *et al.*, 2004; ZAREI *et al.*, 2023), assisting in the management of species used as fishing resources (AVIGLIANO; MARTINEZ; VOLPEDO, 2014; BARNUEVO *et al.*, 2023; FRANCO *et al.*, 2023; IBAÑEZ *et al.*, 2022; KIKUCHI *et al.*, 2021; MORAWICKI; SOLIMANO; VOLPEDO, 2022; MOREIRA *et al.*, 2019; NEVES *et al.*, 2021; SOETH *et al.*, 2022), and also used to explain the current distribution of many species, although few studies on neotropical fish employing otolith shape to distinguish populations are available (DA COSTA *et al.*, 2018; MERELES *et al.*, 2021).

Our results indicate that otolith shape assessments comprise an interesting tool to differentiate isolated freshwater fish populations, as the only studied *S. barbatus* populations that presented overlaps in the canonical analyses and $p > 0.05$ for the Fourier and Wavelets coefficients were those sampled in the Paranaguá (DM) and Guaraqueçaba (GR) coastal streams. These streams are inserted in water bodies that flow into the Paranaguá bay, in southern Brazil, which were once connected by paleodrainage (THOMAZ *et al.*, 2015). Non-significant values ($p > 0.05$) for the Wavelet coefficients were also observed among populations sampled in Joinville (CU) and Paranaguá (DM), both located in nearby paleodrainages.

Although the factors that determine otolith shapes are not fully understood, as they can be generated and influenced by ontogeny, adaptations, sexual dimorphism, phylogenetic and biogeographical processes (TUSET *et al.*, 2016), the combination of genetic and environmental causes may be responsible for the differentiation of the otolith shapes in geographically isolated populations (BERG *et al.*, 2018; CARDINALE *et al.*, 2004; SANTOS; VAZ-DOS-SANTOS, 2023; VIGNON; MORAT, 2010). The combination of these factors may explain otolith shape differences among the investigated *S. barbatus* populations, which despite being restricted to coastal Atlantic Rainforest streams, is widely distributed (OYAKAWA *et al.*, 2006; REIS, 2003), inhabiting regions presenting different climatic conditions.

The otolith shape analysis applied herein was efficient in geographically discriminating the sampled groups and may contribute to a better understanding of the current *S. barbatus* distribution in the Atlantic Forest. However, additional studies

are required to investigate the influence of genetic effects and their environmental interactions to better understand how these factors can affect otolith shape among different *S. barbatus* populations.

REFERENCES

- ABILHOA, V. *et al.* Fishes of the Atlantic Rain Forest streams: ecological patterns and conservation. **Changing diversity in changing environment**, v. 1, p. 259–282, 2011.
- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the ‘revolution’. **Italian journal of zoology**, v. 71, n. 1, p. 5-16, 2009.
- ADELIR-ALVES, J. *et al.* Otoliths as a tool to study reef fish population structure from coastal islands of South Brazil. **Marine Biology Research**, v. 14, n. 9–10, p. 973–988, 2018.
- ALEXANDROU, M. A. *et al.* Competition and phylogeny determine community structure in Müllerian co-mimics. **Nature**, v. 469, n. 7328, p. 84–88, 2011.
- ARANHA, J. M. R.; TAKEUTI, D. F.; YOSHIMURA, T. M. Habitat use and food partitioning of the fishes in a coastal stream of Atlantic Forest, Brazil. **Revista de Biología Tropical**, v. 46, n. 4, p. 951–959, 1998.
- ASSIS, C. A. The lagenar otoliths of teleosts: their morphology and its application in species identification, phylogeny and systematics. **Journal of Fish Biology**, v. 62, n. 6, p. 1268–1295, 1 jun. 2003.
- ASSIS, C. A. The utricular otoliths, lapilli, of teleosts: Their morphology and relevance for species identification and systematics studies. **Scientia Marina**, v. 69, n. 2, p. 259–273, 2005.
- AVIGLIANO, E.; MARTINEZ, C. F. R.; VOLPEDO, A. V. Combined use of otolith microchemistry and morphometry as indicators of the habitat of the silverside (*Odontesthes bonariensis*) in a freshwater-estuarine environment. **Fisheries Research**, v. 149, p. 55–60, 2014.
- BARNUEVO, K. D. E. *et al.* Distinct Stocks of the Redtail Scad *Decapterus kurroides* Bleeker, 1855 (Perciformes: Carangidae) from the Northern Sulu and Southern Sibuyan Seas, Philippines Revealed from Otolith Morphometry and Shape Analysis. **Fishes**, v. 8, n. 1, 2023.
- BERG, F. *et al.* Genetic factors have a major effect on growth, number of vertebrae and otolith shape in Atlantic herring (*Clupea harengus*). **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2018.
- BOSE, A. P. H. *et al.* Growth and otolith morphology vary with alternative reproductive tactics and contaminant exposure in the round goby *Neogobius melanostomus*. **Journal of Fish Biology**, v. 93, n. 4, p. 674–684, 2018.

- BOSE, A. P. H.; ADRAGNA, J. B.; BALSHINE, S. Otolith morphology varies between populations, sexes and male alternative reproductive tactics in a vocal toadfish *Porichthys notatus*. **Journal of Fish Biology**, v. 90, n. 1, p. 311–325, 2017.
- BOUDINAR, A. S. *et al.* Otolith shape analysis and mitochondrial DNA markers distinguish three sand smelt species in the *Atherina boyeri* species complex in western Mediterranean. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 182, p. 202–210, 5 dez. 2016.
- BREMM, C.; SCHULZ, U. Otolith atlas of fish of the Sinos River. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 2, p. 274–282, 2014.
- BRITTO, M. R. Phylogeny of the subfamily Corydoradinae Hoedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 153, n. 1, p. 119–154, 2003.
- BRITTO, M. R.; FUKAKUSA, C. K.; MALABARBA, L. R. New species of *Scleromystax* Günther, 1864 (Siluriformes: Callichthyidae) - extending the meridional distribution of genera endemic to the Atlantic Forest. **Neotropical Ichthyology**, v. 14, n. 3, p. 150158, 30 set. 2016.
- CARDINALE, M. *et al.* Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 61, n. 2, p. 158–167, 2004.
- CUTRIM, L.; BATISTA, V. DA S. Determinação de idade e crescimento do mapará (*Hypophthalmus marginatus*) na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 35, p. 85–92, 2005.
- DA COSTA, R. M. R. *et al.* Plasticity in the shape and growth pattern of asteriscus otolith of black prochilodus *Prochilodus nigricans* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) freshwater neotropical migratory fish. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 4, p. 1–10, 2018.
- DENG, X.; WAGNER, H.; POPPER, A. N. Interspecific variations of inner ear structure in the deep-sea fish family Melamphaidae. **The Anatomical Record**, v. 296, n. 7, p. 1064–1082, 2013.
- D'IGLIO, C. *et al.* Intraspecific variability of the saccular and utricular otoliths of the hatchetfish *Argyropelecus hemigymnus* (Cocco, 1829) from the Strait of Messina (Central Mediterranean Sea). **Plos one**, v. 18, n. 2, p. e0281621, 2023.
- FRANCO, T. P. *et al.* Identifying Whitemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*) Populations along the Rio de Janeiro Coast, Brazil, through Microsatellite and Otolith Analyses. **Biology**, v. 12, n. 3, p. 360, 2023.
- FUCHS, D. V.; VOLPEDO, A. V. Morfología de lapillus de siluriformes parano-platenses. **Biología Acuática**, n. 26, p. 97–108, 2009.

- GARAVELLO, J. C. *et al.* Integrative taxonomy reveals a new species of Neotropical headstanding fish in genus *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 19, 2021.
- GONÇALVES, C. DA S.; CESTARI, C. Uso de riacho costeiro da mata atlântica pelo limpa-fundo *Scleromystax barbatus* (Quoy & Gaimard, 1824). **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, n. 3, p. 115–120, 2013.
- GRAPS, A. An Introduction to Wavelets. **IEEE Computational Science and Engineering**, v. 2, n. 2, p. 50–61, 1995.
- HÜSSY, K. *et al.* Evaluation of otolith shape as a tool for stock discrimination in marine fishes using Baltic Sea cod as a case study. **Fisheries Research**, v. 174, p. 210–218, 1 fev. 2016.
- IBAÑEZ, A. *et al.* Unraveling the *Mugil curema* complex of American coasts integrating genetic variations and otolith shapes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, p. 107914, 2022.
- KIKUCHI, E. *et al.* Discrimination of red porgy *Pagrus pagrus* (Sparidae) potential stocks in the south-western Atlantic by otolith shape analysis. **Journal of Fish Biology**, v. 98, n. 2, p. 548–556, 2021.
- LESTREL, P. E. **Fourier descriptors and their applications in biology**. Cambridge University Press, 1997.
- LIBUNGAN, L. A.; PÁLSSON, S. ShapeR: An R package to study otolith shape variation among fish populations. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015.
- LOMBARTE, A.; CASTELLÓN, A. Interspecific and intraspecific otolith variability in the genus *Merluccius* as determined by image analysis. **Canadian journal of zoology**, v. 69, n. 9, p. 2442–2449, 1991.
- LOMBARTE, A.; LLEONART, J. Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. **Environmental biology of fishes**, v. 37, n. 3, p. 297–306, 1993.
- LUJAN, N. K.; ARMBRUSTER, J. W. Morphological and functional diversity of the mandible in suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **Journal of Morphology**, v. 273, n. 1, p. 24–39, 2012.
- MACIEL, T. R. *et al.* Sexual dimorphism in the catfish *Genidens genidens* (Siluriformes: Ariidae) based on otolith morphometry and relative growth. **Neotropical Ichthyology**, v. 17, 2019.
- MALABARBA, L. R.; MALABARBA, M. C. **Phylogeny and classification of neotropical fish**. Elsevier Inc., 2019.

- MENEZES, N. A. *et al.* **Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais.** São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2007.
- MERELES, M. A. *et al.* Discrimination of species and populations of the genus *Cichla* (Cichliformes: Cichlidae) in rivers of the Amazon basin using otolithic morphometry. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, 2021.
- MORAWICKI, S.; SOLIMANO, P. J.; VOLPEDO, A. V. Unravelling Stock Spatial Structure of Silverside *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes, 1835) from the North Argentinian Coast by Otoliths Shape Analysis. **Fishes**, v. 7, n. 4, 2022.
- MOREIRA, C. *et al.* Otolith shape analysis as a tool to infer the population structure of the blue jack mackerel, *Trachurus picturatus*, in the NE Atlantic. **Fisheries Research**, v. 209, n. September 2018, p. 40–48, 2019.
- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 24 fev. 2000.
- NEVES, J. *et al.* Population structure of the European sardine *Sardina pilchardus* from Atlantic and Mediterranean waters based on otolith shape analysis. **Fisheries Research**, v. 243, n. November 2020, 2021.
- OKSANEN, J. *et al.* Package ‘vegan’. **Community ecology package, version**, v. 2, n. 9, p. 1–295, 2013.
- OYAKAWA, O. T. *et al.* **Peixes de riachos da Mata Atlântica: nas unidades de conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo.** São Paulo: Neotropica, 2006.
- PADIAL, J. M. *et al.* The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2010.
- PAUL, K.; OEBERST, R.; HAMMER, C. Evaluation of otolith shape analysis as a tool for discriminating adults of Baltic cod stocks. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n. 4, p. 743–750, 2013.
- PAVLOV, D. A. Otolith Morphology in Gibel Carp *Carassius gibelio* and Crucian Carp *C. carassius* (Cyprinidae). **Journal of Ichthyology**, v. 62, n. 6, p. 1067–1080, 2022.
- PLATT, C.; POPPER, A. N. **Fine structure and function of the ear.** In: Hearing and sound communication in fishes. Springer, 1981. p. 3–38.
- POPPER, A. N.; RAMCHARITAR, J.; CAMPANA, S. E. Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology. **Marine and freshwater Research**, v. 56, n. 5, p. 497–504, 2005.
- QIAO, J. *et al.* Comparative Otolith Morphology of Two Morphs of *Schizopygopsis thermalis* Herzenstein 1891 (Pisces, Cyprinidae) in a Headwater Lake on the Qinghai-Tibet Plateau. **Fishes**, v. 7, n. 3, 2022.

REIS, R. E. **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. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 225–246, 2006.

RIBEIRO, M. C. *et al.* The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.

RODRÍGUEZ MENDOZA, R. P. Otoliths and their applications in fishery science. **Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo**, v. 64, n. 3, p. 89–102, 29 set. 2006.

ROXO, F. F. *et al.* Molecular phylogeny and biogeographic history of the armored Neotropical catfish subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyriinae (Siluriformes: Loricariidae). **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105564, 2014.

SÁNCHEZ, R. O.; MARTÍNEZ, V. H. Morphological variations of the three otoliths of some species of the family loricariidae (Ostariophysi: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2017.

SANTOS, L.; VAZ-DOS-SANTOS, A. M. Insights of Otoliths Morphology to Reveal Patterns of Teleostean Fishes in the Southern Atlantic. **Fishes**, v. 8, n. 1, 2023.

SCHULZ-MIRBACH, T.; HESS, M.; PLATH, M. Inner ear morphology in the Atlantic molly *Poecilia mexicana*—first detailed microanatomical study of the inner ear of a cyprinodontiform species. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27734, 2011.

SOETH, M. *et al.* Otolith phenotypic variation as an indicator of stock structure of *Scomberomorus brasiliensis* from the southwestern Atlantic Ocean. **Fisheries Research**, v. 252, p. 106357, 1 ago. 2022.

SOUZA, C. S. *et al.* Genetic and morphological analyses demonstrate that *Schizolecis guntheri* (Siluriformes: Loricariidae) is likely to be a species complex. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 69, 2018.

STRANSKY, C. *et al.* **Separation of Norwegian coastal cod and Northeast Arctic cod by outer otolith shape analysis.** Fisheries Research, v. 90, n. 1–3, p. 26–35, 2008.

THOMAZ, A. T. *et al.* Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: Study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, v. 42, n. 12, p. 2389–2401, 2015.

THOMAZ, A. T.; KNOWLES, L. L. Flowing into the unknown: inferred paleodrainages for studying the ichthyofauna of Brazilian coastal rivers. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, 2018.

THOMAZ, A. T.; MALABARBA, L. R.; KNOWLES, L. L. Genomic signatures of paleodrainages in a freshwater fish along the southeastern coast of Brazil: genetic structure reflects past riverine properties. **Heredity**, v. 119, n. 4, p. 287–294, 2017.

TORRES, R. A.; RIBEIRO, J. The remarkable species complex *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Glandulocaudinae) from the Southern Atlantic Rain forest (Brazil) as revealed by molecular systematic and population genetic analyses. **Hydrobiologia**, v. 617, n. 1, p. 157–170, 2009.

TRACEY, S. R.; LYLE, J. M.; DUHAMEL, G. Application of elliptical Fourier analysis of otolith form as a tool for stock identification. **Fisheries Research**, v. 77, n. 2, p. 138–147, 1 fev. 2006.

TREINEN-CRESPO, C. *et al.* Otolith shape analysis as a tool for population discrimination of the white grunt (*Haemulon plumieri*) stock in the northern coast of the Yucatán Peninsula, Mexico. **Revista Ciencias Marinas y Costeras**, v. 4, p. 157–168, 2012.

TSCHÁ, M. K. *et al.* Past connection and isolation of catchments: The sea-level changes affect the distribution and genetic variability of coastal freshwater fishes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 190, p. 31–39, 2017.

TUSET, V. M. *et al.* Otolith shape lends support to the sensory drive hypothesis in rockfishes. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 29, n. 10, p. 2083–2097, 1 out. 2016.

TUSET, V. M. *et al.* Paradox of otolith shape indices: routine but overestimated use. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 78, n. 6, p. 681–692, 2021.

VIGNON, M.; MORAT, F. Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish. **Marine Ecology Progress Series**, v. 411, p. 231–241, 29 jul. 2010.

VOLPEDO, A. V.; FUCHS, D. V. Ecomorphological patterns of the lapilli of Paranoplatense Siluriforms (South America). **Fisheries Research**, v. 102, n. 1–2, p. 160–165, 1 fev. 2010.

ZAREI, F. *et al.* Phylogeography and population structure of *Ponticola gorlap* (Teleostei: Gobiidae) in an evolutionary distinctive and ecologically threatened Caspian Sea sub-basin. **Aquatic Sciences**, v. 85, n. 1, p. 1–13, 2023.

CONCLUSÃO GERAL

O uso do mitogenoma de *Scleromystax barbatus* ajudou a preencher uma lacuna existente no conhecimento e delimitação de espécies de peixes da região Neotropical, podendo ser útil para estudos futuros em genética e evolução. Nossos resultados indicaram que, embora o gene COI seja considerado eficiente para a identificação molecular de espécies de peixes (PEREIRA et al., 2013), os genes citocromo b, ND4 e RAG1 são mais informativos para a taxonomia molecular de *Scleromystax barbatus*.

O uso de diferentes ferramentas moleculares e a morfometria geométrica do corpo mostraram que as populações analisadas de *Scleromystax barbatus* apresentam uma alta divergência genética e uma baixa diferenciação morfológica. Os resultados das análises de delimitação de espécies baseados nas sequências dos genes citocromo b e ND4 não indicaram uma estruturação clara ao longo da distribuição das populações e sugeriram a existência de muitas unidades taxonômicas, entretanto as análises filogenéticas destes genes separaram as populações em quatro linhagens evolutivas (clados A, B, C e D), com diferenças morfométricas evidentes entre estes agrupamentos.

Baseado nos resultados obtidos, acreditamos que o nome *Scleromystax barbatus* deve ser aplicado para as populações das drenagens costeiras inseridas no estado do Rio de Janeiro e na bacia do Paraíba do Sul (clado A), e que o nome *Scleromystax kronei* deve ser revalidado para as populações que ocorrem na bacia do rio Ribeira de Iguape e bacias adjacentes (clado C). Além disso, os dados moleculares corroboram a ocorrência de duas novas espécies, sendo uma com populações inseridas nas bacias costeiras do Paraná e Santa Catarina (clado D) e outra provavelmente restrita ao litoral norte de São Paulo (clado B).

O padrão morfológico observado para os otólitos *lapillus* de *S. barbatus* é semelhante com as características predominantes do otólito utricular de Callichthyidae, indicando que a forma do otólito pode auxiliar na distinção de espécies de Siluriformes. As análises da forma encontraram diferenças entre todas as populações estudadas, com exceção das amostras provenientes do limite sul da distribuição da espécie. Os resultados indicam que estas análises são ferramentas úteis para investigar variações fenotípicas e identificar populações e espécies.

Importante destacar que os resultados ressaltam a influência da evolução do relevo e da hipótese das paleodrenagens e das conexões pretéritas das porções baixas dos rios litorâneos da Mata Atlântica no entendimento da distribuição e das relações entre as populações de *S. barbatus*, indicando que os processos de retração e transgressão do nível do mar durante o Pleistoceno foram fatores determinantes na estruturação da diversidade observada, resultados congruentes com os encontrados para *Hollandichthys*, *Schizolecis*, *Trichogenes*, *Phalloceros* e *Glandulocaudinae* (CAMELIER et al., 2018; LIMA et al., 2016; SOUTO-SANTOS; JENNINGS; BUCKUP, 2022; SOUZA et al., 2018; THOMAZ et al., 2015).

Este é o primeiro estudo abrangendo toda a distribuição natural de *Scleromystax barbatus* que utilizou ferramentas moleculares e morfológicas para entender as relações entre as diferentes linhagens evolutivas de *S. barbatus*, uma espécie (e gênero) restrita aos riachos de Mata Atlântica.

REFERÊNCIAS

- ABILHOA, V.; BASTOS, L. P. Fish, Cubatão River basin, Atlantic Rainforest stream, Paraná, Brazil. **Check List**, v. 5, n. 1, p. 008–018, 1 jan. 2009.
- ABILHOA, V. *et al.* Fishes of the Atlantic Rain Forest streams: ecological patterns and conservation. **Changing diversity in changing environment**, v. 1, p. 259–282, 2011.
- ADAMS, D. C. A generalized K statistic for estimating phylogenetic signal from shape and other high-dimensional multivariate data. **Systematic Biology**, v. 63, n. 5, p. 685–697, 2014.
- ADAMS, D. C.; OTÁROLA-CASTILLO, E. geomorph: an r package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 393–399, 1 abr. 2013.
- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the ‘revolution’. **Italian journal of zoology**, v. 71, n. 1, p. 5-16, 2009. DOI.10.1080/11250000409356545.
- ADELIR-ALVES, J. *et al.* Otoliths as a tool to study reef fish population structure from coastal islands of South Brazil. **Marine Biology Research**, v. 14, n. 9–10, p. 973–988, 2018.
- AGAPOW, P.-M. *et al.* The impact of species concept on biodiversity studies. **The quarterly review of biology**, v. 79, n. 2, p. 161–179, 2004.
- ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, p. 27–53, 2 nov. 2020. DOI. 10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032
- ALEXANDROU, M. *et al.* Competition and phylogeny determine community structure in Müllerian co-mimics. **Nature**, v. 469, n. 7328, p. 84-88, 2011.
- ALMEIDA, J. S. *et al.* Chromosomal variation in the tropical armored catfish *Callichthys callichthys* (Siluriformes, Callichthyidae): implications for conservation and taxonomy in a species complex from a Brazilian hotspot. **Zebrafish**, v. 10, n. 4, p. 451–458, 2013.
- ANTONELLI, A. *et al.* Conceptual and empirical advances in Neotropical biodiversity research. **peerj.com**, 2018.
- ARANHA, J. M. R.; TAKEUTI, D. F.; YOSHIMURA, T. M. Habitat use and food partitioning of the fishes in a coastal stream of Atlantic Forest, Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 46, n. 4, p. 951–959, 1998.

- ARGOLO, L. A. *et al.* Unraveling the systematics and evolution of the ‘*Geophagus brasiliensis*’ (Cichliformes: Cichlidae) species complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 150, p. 106855, 2020.
- ASSIS, C. A. The lagenar otoliths of teleosts: their morphology and its application in species identification, phylogeny and systematics. **Journal of Fish Biology**, v. 62, n. 6, p. 1268–1295, 1 jun. 2003.
- ASSIS, C. A. The utricular otoliths, lapilli, of teleosts: Their morphology and relevance for species identification and systematics studies. **Scientia Marina**, v. 69, n. 2, p. 259–273, 2005.
- AVIGLIANO, E.; MARTINEZ, C. F. R.; VOLPEDO, A. V. Combined use of otolith microchemistry and morphometry as indicators of the habitat of the silverside (*Odontesthes bonariensis*) in a freshwater-estuarine environment. **Fisheries Research**, v. 149, p. 55–60, 2014.
- BARNUEVO, K. D. E. *et al.* Distinct Stocks of the Redtail Scad *Decapterus kurroides* Bleeker, 1855 (Perciformes: Carangidae) from the Northern Sulu and Southern Sibuyan Seas, Philippines Revealed from Otolith Morphometry and Shape Analysis. **Fishes**, v. 8, n. 1, 2023.
- BARRETO, S. B. *et al.* Is *Nematocharax* (Actinopterygii, Characiformes) a monotypic fish genus? **Genome**, v. 59, n. 10, p. 851–865, 2016.
- BEAUMONT, A.; BOUDRY, P.; HOARE, K. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. **John Wiley & Sons**, 2010.
- BETANCUR-R, R. *et al.* Phylogenetic classification of bony fishes. **BMC evolutionary biology**, v. 17, n. 1, p. 1–40, 2017.
- BERG, F. *et al.* Genetic factors have a major effect on growth, number of vertebrae and otolith shape in Atlantic herring (*Clupea harengus*). **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2018.
- BLEIDORN, C. **Phylogenomics: an introduction**. Springer, 2017.
- BONAPARTE, C. L. A new systematic arrangement of vertebrated animals. **R. Taylor**, 1841.
- BOSE, A. P. H. *et al.* Growth and otolith morphology vary with alternative reproductive tactics and contaminant exposure in the round goby *Neogobius melanostomus*. **Journal of Fish Biology**, v. 93, n. 4, p. 674–684, 2018.
- BOSE, A. P. H.; ADRAGNA, J. B.; BALSHINE, S. Otolith morphology varies between populations, sexes and male alternative reproductive tactics in a vocal toadfish *Porichthys notatus*. **Journal of Fish Biology**, v. 90, n. 1, p. 311–325, 2017.
- BOUDINAR, A. S. *et al.* Otolith shape analysis and mitochondrial DNA markers distinguish three sand smelt species in the *Atherina boyeri* species complex in

western Mediterranean. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 182, p. 202–210, 5 dez. 2016.

BREMM, C.; SCHULZ, U. Otolith atlas of fish of the Sinos River. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 2, p. 274–282, 2014.

BRITTO, M. R. Phylogeny of the subfamily Corydoradinae Hoedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 153, n. 1, p. 119–154, 2003.

BRITTO, M. R.; FUKAKUSA, C. K.; MALABARBA, L. R. New species of *Scleromystax* Günther, 1864 (Siluriformes: Callichthyidae) - extending the meridional distribution of genera endemic to the Atlantic Forest. **Neotropical Ichthyology**, v. 14, n. 3, p. 150158, 30 set. 2016.

BRITTO, M. R.; REIS, R. E. A new *Scleromystax* species (Siluriformes: Callichthyidae) from coastal rivers of southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 4, p. 481–488, dez. 2005.

BRUFORD, M. W. *et al.* Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. **Molecular genetic analysis of populations: a practical approach.**, p. 225–269, 1992.

CAMELIER, P. *et al.* Molecular and morphological data of the freshwater fish *Glandulocauda melanopleura* (Characiformes: Characidae) provide evidences of river captures and local differentiation in the Brazilian Atlantic Forest. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0194247, 2018.

CANDOLIN, U. The use of multiple cues in mate choice. **Biological reviews**, v. 78, n. 4, p. 575–595, 2003.

CARDINALE, M. *et al.* Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 61, n. 2, p. 158–167, 2004.

CARSTENS, B. C. *et al.* How to fail at species delimitation. **Molecular ecology**, v. 22, n. 17, p. 4369–4383, 2013.

CASTRO, R. M. C.; POLAZ, C. N. M. Small-sized fish: the largest and most threatened portion of the megadiverse neotropical freshwater fish fauna. **Biota Neotropica**, v. 20, n. 1, 13 dez. 2019.

CHEN, L. *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of *Corydoras trilineatus* mitochondrial genome. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 5, n. 3, p. 3017–3018, 2020.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1657–1659, out. 2000.

CORNWALLIS, C. K.; ULLER, T. Towards an evolutionary ecology of sexual traits. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 3, p. 145–152, 2010.

- COSTA-SILVA, G. J. *et al.* Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex Neotropical hyperdiverse group. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0135075, 2015.
- COSTA, W. J. E. M. *et al.* Morpho-Molecular Discordance? Re-Approaching Systematics of *Cambeva* (Siluriformes: Trichomycteridae) from the Guaratuba-Babitonga-Itapocu Area, Southern Brazil. **Fishes**, v. 8, n. 2, p. 63, 2023.
- CUNICO, A. M. *et al.* Fish, Maringá urban streams, Pirapó River drainage, upper Paraná River basin, Paraná state, Brazil. **Check List**, v. 5, n. 2, p. 273, 2009.
- CUTRIM, L.; BATISTA, V. DA S. Determinação de idade e crescimento do mapará (*Hypophthalmus marginatus*) na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 35, p. 85–92, 2005.
- DA COSTA, R. M. R. *et al.* Plasticity in the shape and growth pattern of asteriscus otolith of black prochilodus *Prochilodus nigricans* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) freshwater neotropical migratory fish. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 4, p. 1–10, 2018.
- DA ROCHA, R. H. *et al.* Integrated analysis reveals a new species of *Corydoras* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Callichthyidae) in the lower Iguassu River, Brazil. **Organisms Diversity and Evolution**, v. 22, n. 2, p. 457–474, 1 jun. 2022.
- DE BRITO, V.; BUCKUP, P. A. The fish fauna of the upper Pirai drainage, a transposed mountain river system in southeastern, Brazil. **Check List**, v. 15, n. 1, p. 235, 2019.
- DENG, X.; WAGNER, H.; POPPER, A. N. Interspecific variations of inner ear structure in the deep-sea fish family Melamphaidae. **The Anatomical Record**, v. 296, n. 7, p. 1064–1082, 2013.
- DE PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes: Historical overview and synthesis of hypothesis. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, p. 279–330, 1998.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 879–886, 2007.
- DELLICOUR, S.; FLOT, J.-F. Delimiting species-poor data sets using single molecular markers: a study of barcode gaps, haplowebs and GMYC. **Systematic Biology**, v. 64, n. 6, p. 900–908, 2015.
- DIAS, M. S. *et al.* Global imprint of historical connectivity on freshwater fish biodiversity. **Ecology Letters**, v. 17, n. 9, p. 1130–1140, 1 set. 2014.
- D'IGLIO, C. *et al.* Intraspecific variability of the saccular and utricular otoliths of the hatchetfish *Argyropelecus hemigymnus* (Cocco, 1829) from the Strait of Messina (Central Mediterranean Sea). **Plos one**, v. 18, n. 2, p. e0281621, 2023.

- DONIN, L. M.; FERRER, J.; CARVALHO, T. P. Uncertainties and risks in delimiting species of *Cambeva* (Siluriformes: Trichomycteridae) with single-locus methods and geographically restricted data. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, 2022.
- DOMINGOS, F. F. T. *et al.* Assessment of fish assemblage in an urban system, Itapecerica River, upper São Francisco River basin, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil. **Check List**, v. 9, n. 3, p. 482–486, 2013.
- DRUMMOND, A. J. *et al.* Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular biology and evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012.
- EIGENMANN, C. H.; SMITH-EIGENMANN, R. Preliminary notes on South American nematognathi. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v.2, p.28-56, 1889.
- ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Species by family/subfamily. **Catalog of fishes**, 2023.
- ESTEVES, K. E.; LOBÓN-CERVIÁ, J. Composition and trophic structure of a fish community of a clear water Atlantic rainforest stream in southeastern Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 62, p. 429–440, 2001.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p. 47–50, fev. 2007.
- FEILICH, K. L.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. When Does Form Reflect Function? Acknowledging and Supporting Ecomorphological Assumptions. **Integrative and Comparative Biology**, v. 59, n. 2, p. 358–370, 2019.
- FERGUSON, J. W. H. On the use of genetic divergence for identifying species. **Biological journal of the Linnean Society**, v. 75, n. 4, p. 509–516, 2002.
- FERRARIS, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, n. 1, p. 1–628, 2007.
- FORNEL, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. **PPG-Ecologia**, Erechim, v. 1, n. 1, p. 101–120, 2012.
- FRANCO, T. P. *et al.* Identifying Whitemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*) Populations along the Rio de Janeiro Coast, Brazil, through Microsatellite and Otolith Analyses. **Biology**, v. 12, n. 3, p. 360, 2023.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2008.
- FREDERICH, B.; ADRIAENS, D.; VANDEWALLE, P. Ontogenetic shape changes in Pomacentridae (Teleostei, Perciformes) and their relationships with feeding

strategies: a geometric morphometric approach. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 95, n. 1, p. 92–105, 1 set. 2008.

FUCHS, D. V.; VOLPEDO, A. V. Morfología de lapillus de siluriformes parano-platenses. **Biología Acuática**, n. 26, p. 97–108, 2009.

FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. **Systematic biology**, v. 62, n. 5, p. 707–24, 2013.

GARAVELLO, J. C. *et al.* Integrative taxonomy reveals a new species of Neotropical headstanding fish in genus *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 19, 2021.

GARCEZ, D. K. *et al.* Phylogeography of the critically endangered neotropical annual fish, *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Aplocheilidae): genetic and morphometric evidence of a new species complex. **Environmental Biology of Fishes**, v. 101, n. 10, p. 1503–1515, 2018.

GARCIA-MELO, J. E. *et al.* Species delimitation of neotropical Characins (Stevardiinae): Implications for taxonomy of complex groups. **PLoS One**, v. 14, n. 6, p. e0216786, 2019.

GEE, J. H.; GRAHAM, J. B. Respiratory and hydrostatic functions of the intestine of the catfishes *Hoplosternum thoracatum* and *Brochis splendens* (Callichthyidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 74, n. 1, p. 1–16, 1 jun. 1978.

GONÇALVES, C. DA S. *et al.* Identification key for fishes from coastal streams of the Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 17, 2017.

GONÇALVES, C. DA S.; BRAGA, F. M. DE S. Changes in ichthyofauna composition along a gradient from clearwaters to blackwaters in coastal streams of Atlantic forest (southeastern Brazil) in relation to environmental variables. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, p. 675–684, 2012.

GONÇALVES, C. DA S.; CESTARI, C. Uso de riacho costeiro da mata atlântica pelo limpa-fundo *Scleromystax barbatus* (Quoy & Gaimard, 1824). **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, n. 3, p. 115–120, 2013.

GOSLINE, W. A. A revision of the Neotropical catfishes of the family Callichthyidae. **Stan. Lchth. Bull.**, v. 2, p. 1–29, 1940.

GRAPS, A. An Introduction to Wavelets. **IEEE Computational Science and Engineering**, v. 2, n. 2, p. 50–61, 1995.

GÜNTHER, A. Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiatidae in the collection of the British Museum. **Catalogue of the fishes in the British Museum**, v. 5, p. 1-22, 1864.

HARRISON, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 4, n. 1, p. 6–11, 1989.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, 2003.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.

HENRIQUES, J. M. *et al.* Use of DNA barcode in the identification of fish species from Ribeira de Iguape Basin and coastal rivers from São Paulo State (Brazil). **DNA Barcodes**, v. 3, n. 1, p. 118–128, 2015.

HÜSSY, K. *et al.* Evaluation of otolith shape as a tool for stock discrimination in marine fishes using Baltic Sea cod as a case study. **Fisheries Research**, v. 174, p. 210–218, 1 fev. 2016.

IBAÑEZ, A. *et al.* Unraveling the *Mugil curema* complex of American coasts integrating genetic variations and otolith shapes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, p. 107914, 2022.

IWASAKI, W. *et al.* MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 11, p. 2531–2540, nov. 2013.

JIN, J. J. *et al.* GetOrganelle: A fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes. **Genome Biology**, v. 21, n. 1, p. 1–31, set. 2020.

KATOH, K. *et al.* MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 2002.

KENDALL, D. G. The diffusion of shape. **Advances in applied probability**, v. 9, n. 3, p. 428–430, 1977.

KIKUCHI, E. *et al.* Discrimination of red porgy *Pagrus pagrus* (Sparidae) potential stocks in the south-western Atlantic by otolith shape analysis. **Journal of Fish Biology**, v. 98, n. 2, p. 548–556, 2021.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, p. 111–120, 1980.

KLINGENBERG, C. P. Methods for studying allometry in geometric morphometrics: a comparison of performance. **Evolutionary Ecology**, v. 36, n. 4, p. 439–470, 1 ago. 2022.

- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–4, 2016.
- LEAVITT, S. *et al.* DNA barcode identification of lichen-forming fungal species in the *Rhizoplaca melanophthalma* species-complex (Lecanorales, Lecanoraceae), including five new species. **MycoKeys**, v. 7, p. 1–22, 2013.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.
- LESTREL, P. E. **Fourier descriptors and their applications in biology**. Cambridge University Press, 1997.
- LIBUNGAN, L. A.; PÁLSSON, S. ShapeR: An R package to study otolith shape variation among fish populations. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015.
- LIMA, S. M. Q. *et al.* Effects of Pleistocene climatic and geomorphological changes on the population structure of the restricted-range catfish *Trichogenes longipinnis* (Siluriformes: Trichomycteridae). **Systematics and biodiversity**, v. 14, n. 2, p. 155–170, 2016.
- LIU, Qiaolin *et al.* Complete mitochondrial genome of *Corydoras panda* (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae, Corydoradinae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 2878-2879, 2019a.
- LIU, Qiaolin *et al.* Next-generation sequencing yields the complete mitochondrial genome of *Corydoras sterbai* (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae, Corydoradinae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 2880-2881, 2019b.
- LIU, Q.; XU, B.; XIAO, T. Complete mitochondrial genome of *Corydoras duplicareus* (Teleostei, Siluriformes, Callichthyidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 1, p. 1832-1833, 2019.
- LIU, Yi *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of *Corydoras arcuatus* mitochondrial genome. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 2876-2877, 2019c.
- LOMBARTE, A.; CASTELLÓN, A. Interspecific and intraspecific otolith variability in the genus *Merluccius* as determined by image analysis. **Canadian journal of zoology**, v. 69, n. 9, p. 2442–2449, 1991.
- LOMBARTE, A.; LLEONART, J. Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. **Environmental biology of fishes**, v. 37, n. 3, p. 297–306, 1993.
- LUJAN, N. K.; ARMBRUSTER, J. W. Morphological and functional diversity of the mandible in suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **Journal of Morphology**, v. 273, n. 1, p. 24–39, 2012.

LUO, A. *et al.* Comparison of methods for molecular species delimitation across a range of speciation scenarios. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 830–846, 2018.

MA, C. *et al.* Mitochondrial genomes reveal the global phylogeography and dispersal routes of the migratory locust. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 17, p. 4344–4358, 2012.

MACIEL, T. R. *et al.* Sexual dimorphism in the catfish *Genidens genidens* (Siluriformes: Ariidae) based on otolith morphometry and relative growth. **Neotropical Ichthyology**, v. 17, 2019.

MALABARBA, L. R.; MALABARBA, M. C. **Phylogeny and classification of neotropical fish**. Elsevier Inc., 2019.

MARBURGER, S. *et al.* Whole genome duplication and transposable element proliferation drive genome expansion in Corydoradinae catfishes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1872, 14 fev. 2018.

MARIGUELA, T. C. *et al.* Historical biogeography and cryptic diversity in the Callichthyinae (Siluriformes, Callichthyidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 51, n. 4, p. 308–315, 2013.

MASTROCHIRICO FILHO, V. A. *et al.* Genetic applications in the conservation of Neotropical freshwater fish. **Biological resources of water**, p. 249–284, 2018.

MENEZES, N. A. *et al.* **Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2007.

MERELES, M. A. *et al.* Discrimination of species and populations of the genus *Cichla* (Cichliformes: Cichlidae) in rivers of the Amazon basin using otolithic morphometry. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, 2021.

MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. **The Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. eds by P. W. Hochachka and T. P. Mommsen, Elsevier Press, New York, p. 1–38, 1993.

MIRANDA RIBEIRO, A. Peixes do Iporanga—S. Paulo. Resultados de excursões do Sr. Ricardo Krone, membro correspondente do Museu Nacional do Rio de Janeiro. **Boletim Sociedade Nacional de Agricultura**, Rio de Janeiro [Lavoura], v. 11, p. 185–190, 1907.

MITTEROECKER, P.; GUNZ, P. Advances in geometric morphometrics. **Evolutionary Biology**, v. 36, n. 2, p. 235–247, 2009.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. **Princípios de morfometria geométrica. In: Princípios de morfometria geométrica**. 1999. p. 189-189.

MORAWICKI, S.; SOLIMANO, P. J.; VOLPEDO, A. V. Unravelling Stock Spatial Structure of Silverside *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes, 1835) from the North Argentinian Coast by Otoliths Shape Analysis. **Fishes**, v. 7, n. 4, 2022.

- MOREIRA, C. *et al.* Otolith shape analysis as a tool to infer the population structure of the blue jack mackerel, *Trachurus picturatus*, in the NE Atlantic. **Fisheries Research**, v. 209, n. September 2018, p. 40–48, 2019.
- MOREIRA, D. A. *et al.* The complete mitochondrial genome of *Corydoras nattereri* (Callichthyidae: Corydoradinae). **Neotropical Ichthyology**, v. 14, n. 1, 2016.
- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 24 fev. 2000.
- NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolution and phylogenetics. **Oxford University Press**, USA, 2000.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the World: Fifth Edition**. Fishes of the World: Fifth Edition, p. 1–707, 14 mar. 2016.
- NEVES, J. *et al.* Population structure of the European sardine *Sardina pilchardus* from Atlantic and Mediterranean waters based on otolith shape analysis. **Fisheries Research**, v. 243, n. November 2020, 2021.
- NIJSSEN, H.; ISBRÜCKER, I. J. H. A review of the genus *Corydoras* Lacépède, 1803 (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Bijdragen tot de Dierkunde**, v. 50, n. 1, p. 190–220, 1980.
- OKSANEN, J. *et al.* Package ‘vegan’. **Community ecology package, version**, v. 2, n. 9, p. 1–295, 2013.
- OYAKAWA, O. T. *et al.* **Peixes de riachos da Mata Atlântica:: nas unidades de conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo**. São Paulo: Neotropica, 2006.
- PADIAL, J. M. *et al.* The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2010.
- PADIAL, J. M. *et al.* The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2010.
- PADIAL, J. M.; DE LA RIVA, I. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 155, n. 1, p. 97–122, 2009.
- PANG, X. *et al.* Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae. **Planta medica**, v. 76, n. 15, p. 1784–1786, 2010.
- PAPAKOSTAS, S. *et al.* Integrative taxonomy recognizes evolutionary units despite widespread mitonuclear discordance: evidence from a rotifer cryptic species complex. **Systematic Biology**, v. 65, n. 3, p. 508–524, 2016.

- PARENTE, T. E. *et al.* Remarkable genetic homogeneity supports a single widespread species of *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae) in South America. **Conservation Genetics Resources**, v. 10, n. 3, p. 563–569, 1 set. 2018.
- PAUL, K.; OEBERST, R.; HAMMER, C. Evaluation of otolith shape analysis as a tool for discriminating adults of Baltic cod stocks. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n. 4, p. 743–750, 2013.
- PAVLOV, D. A. Otolith Morphology in Gibel Carp *Carassius gibelio* and Crucian Carp *C. carassius* (Cyprinidae). **Journal of Ichthyology**, v. 62, n. 6, p. 1067–1080, 2022.
- PINHEIRO, P. C.; DALCIN, R. H.; BATISTA, T. T. A ictiofauna de áreas com interesse para a proteção ambiental de Joinville, Santa Catarina, Brasil. **Acta Biológica Catarinense**, v. 4, n. 3, 21 dez. 2017.
- PLATT, C.; POPPER, A. N. **Fine structure and function of the ear**. In: Hearing and sound communication in fishes. Springer, 1981. p. 3–38.
- POMPEU, PAULO S.; ALVES, Carlos Bernardo M.; CALLISTO, MARCOS. The effects of urbanization on biodiversity and water quality in the Rio das Velhas basin, Brazil. In: **American Fisheries Society Symposium**. p. 11-22, 2005.
- PONS, J. *et al.* Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic biology**, v. 55, n. 4, p. 595–609, 2006.
- POPPER, A. N.; RAMCHARITAR, J.; CAMPANA, S. E. Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology. **Marine and freshwater Research**, v. 56, n. 5, p. 497–504, 2005.
- POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.
- PUGEDO, M. L. *et al.* Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin. **Genetica**, v. 144, n. 3, p. 341–349, 2016.
- PULLANDRE, N.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ASAP: assemble species by automatic partitioning. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n. 2, p. 609–620, 2021.
- QIAO, J. *et al.* Comparative Otolith Morphology of Two Morphs of *Schizopygopsis thermalis* Herzenstein 1891 (Pisces, Cyprinidae) in a Headwater Lake on the Qinghai-Tibet Plateau. **Fishes**, v. 7, n. 3, 2022.
- RAMBAUT, A. *et al.* Tracer v1. 6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>, 2014.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e66213, 2013.

- REIS, R. E. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 124, n. 2, p. 105–168, 1998.
- REIS, R. E. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.
- REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12–47, 1 jul. 2016.
- RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: An example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 225–246, 2006.
- RIBEIRO, M. C. *et al.* The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.
- ROCHA-REIS, D. A. *et al.* The complete mitochondrial genome of two armored catfish populations of the genus *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 579965, 2020.
- RODRÍGUEZ MENDOZA, R. P. Otoliths and their applications in fishery science. **Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo**, v. 64, n. 3, p. 89–102, 29 set. 2006.
- ROHLF, F. J. **tpsUtil, file utility program, version 1.26**. Department of Ecology and Evolution, state university of new york at stony brook, 2004.
- ROHLF, F. J. **tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.05**. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 2005.
- RONQUIST, F. Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. **Syst Biol**, v. 46, n. 1, p. 195–203, 1997.
- ROXO, F. F. *et al.* Molecular phylogeny and biogeographic history of the armored Neotropical catfish subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyrinae (Siluriformes: Loricariidae). **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105564, 2014.
- SAITOH, K. *et al.* Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. **Journal of Molecular Evolution**, v. 56, n. 4, p. 464–472, 2003.
- SÁNCHEZ, R. O.; MARTÍNEZ, V. H. Morphological variations of the three otoliths of some species of the family loricariidae (Ostariophysi: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2017.
- SANTOS DE LUCENA, C. A. *et al.* Conjectures and refutations: Species diversity and phylogeny of *Australoheros* from coastal rivers of southern South America (Teleostei: Cichlidae). **Plos one**, v. 17, n. 12, p. e0261027, 2022.

SANTOS, L.; VAZ-DOS-SANTOS, A. M. Insights of Otoliths Morphology to Reveal Patterns of Teleostean Fishes in the Southern Atlantic. **Fishes**, v. 8, n. 1, 2023.

SCHLAGER, S. Morpho and Rvcg – Shape Analysis in R: R-Packages for Geometric Morphometrics, Shape Analysis and Surface Manipulations. **Statistical Shape and Deformation Analysis: Methods. Implementation and Applications**, p. 217–256, 1 jan. 2017.

SCHULZ-MIRBACH, T.; HESS, M.; PLATH, M. Inner ear morphology in the Atlantic molly *Poecilia mexicana*—first detailed microanatomical study of the inner ear of a cyprinodontiform species. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27734, 2011.

SEVILLA, R. G. *et al.* Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 5, p. 730–734, 1 set. 2007.

SHERRATT, E. **Quick Guide to Geomorph 3.0.2**. n. August, p. 145, 2016.

SHIMABUKURO-DIAS, C. K. *et al.* Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 152–163, 1 jul. 2004.

SIDLAUSKAS, B. L.; MOL, J. H.; VARI, R. P. Dealing with allometry in linear and geometric morphometrics: a taxonomic case study in the *Leporinus cylindriformis* group (Characiformes: Anostomidae) with description of a new species from Suriname. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 162, n. 1, p. 103–130, 1 maio 2011.

SITES JR, J. W.; MARSHALL, J. C. Operational criteria for delimiting species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, p. 199–227, 2004.

SOETH, M. *et al.* Otolith phenotypic variation as an indicator of stock structure of *Scomberomorus brasiliensis* from the southwestern Atlantic Ocean. **Fisheries Research**, v. 252, p. 106357, 1 ago. 2022.

SOUTO-SANTOS, I. C. A.; JENNINGS, W. B.; BUCKUP, P. A. Testing palaeodrainage hypotheses in south-eastern Brazil: phylogeography of the sinistral livebearer fish of the genus *Phalloceros* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 2022.

SOUZA, C. S. *et al.* Genetic and morphological analyses demonstrate that *Schizolecis guntheri* (Siluriformes: Loricariidae) is likely to be a species complex. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 69, 2018.

SPADELLA, M. A. *et al.* Variation in male reproductive system characters in Corydoradinae (Loricarioidei: Callichthyidae) reflects the occurrence of different lineages in this subfamily. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, 2017.

STRANSKY, C. *et al.* **Separation of Norwegian coastal cod and Northeast Arctic cod by outer otolith shape analysis.** *Fisheries Research*, v. 90, n. 1–3, p. 26–35, 2008.

SUN, C. H. *et al.* Comparative analysis of the mitogenomes of two *Corydoras* (Siluriformes, Loricarioidei) with nine known *Corydoras*, and a phylogenetic analysis of Loricarioidei. **ZooKeys**, v. 1083, n. 1083, p. 89, 2022.

TALAVERA, G.; DINCĂ, V.; VILA, R. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 12, p. 1101–1110, 2013.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.

TAN, D. S. H. *et al.* From 'cryptic species' to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae: Diptera). **Zoologica Scripta**, v. 39, n. 1, p. 51–61, 2010.

TEAM, R. C. R. **A language and environment for statistical computing [Computer software manual]**. Vienna, Austria., 2019.

TENCATT, L. F. C. *et al.* Taxonomy of the armored catfish genus *Aspidoras* (Siluriformes: Callichthyidae) revisited, with the description of a new species. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, n. 3, 14 out. 2022a.

TENCATT, L. F. C. *et al.* Science and hobby joining forces for the discovery of three new *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from the rio Tapajós basin, Brazil, with comments on *Corydoras* sp. CW111. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, n. 3, p. 2022, 14 out. 2022b.

THOMAZ, A. T. *et al.* Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: Study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, v. 42, n. 12, p. 2389–2401, 2015.

THOMAZ, A. T.; KNOWLES, L. L. Flowing into the unknown: inferred paleodrainages for studying the ichthyofauna of Brazilian coastal rivers. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, 2018.

THOMAZ, A. T.; MALABARBA, L. R.; KNOWLES, L. L. Genomic signatures of paleodrainages in a freshwater fish along the southeastern coast of Brazil: genetic structure reflects past riverine properties. **Heredity**, v. 119, n. 4, p. 287–294, 2017.

TORRES, R. A.; RIBEIRO, J. The remarkable species complex *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Glandulocaudinae) from the Southern Atlantic Rain forest (Brazil) as revealed by molecular systematic and population genetic analyses. **Hydrobiologia**, v. 617, n. 1, p. 157–170, 2009.

TRACEY, S. R.; LYLE, J. M.; DUHAMEL, G. Application of elliptical Fourier analysis of otolith form as a tool for stock identification. **Fisheries Research**, v. 77, n. 2, p. 138–147, 1 fev. 2006.

TREINEN-CRESPO, C. *et al.* Otolith shape analysis as a tool for population discrimination of the white grunt (*Haemulon plumieri*) stock in the northern coast of the Yucatán Peninsula, Mexico. **Revista Ciencias Marinas y Costeras**, v. 4, p. 157–168, 2012.

TRESBACH, R. H. *et al.* DNA barcoding: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 2, p. 77–81, 2015.

TSCHÁ, M. K. *et al.* Past connection and isolation of catchments: The sea-level changes affect the distribution and genetic variability of coastal freshwater fishes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 190, p. 31–39, 2017.

TUSET, V. M. *et al.* Otolith shape lends support to the sensory drive hypothesis in rockfishes. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 29, n. 10, p. 2083–2097, 1 out. 2016.

TUSET, V. M. *et al.* Paradox of otolith shape indices: routine but overestimated use. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 78, n. 6, p. 681–692, 2021.

VIGNON, M.; MORAT, F. Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish. **Marine Ecology Progress Series**, v. 411, p. 231–241, 29 jul. 2010.

VOLPEDO, A. V.; FUCHS, D. V. Ecomorphological patterns of the lapilli of Paranoplatense Siluriforms (South America). **Fisheries Research**, v. 102, n. 1–2, p. 160–165, 1 fev. 2010.

WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays**, v. 29, n. 2, p. 188–197, 2007.

WICK, R. R. *et al.* Bandage: Interactive visualization of de novo genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 31, n. 20, p. 3350–3352, 2015.

WIENS, J. J.; KUCZYNSKI, C. A.; STEPHENS, P. R. Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: implications for speciation and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, n. 2, p. 445–461, 2010.

WOLSTENHOLME, D. R. Genetic novelties in mitochondrial genomes of multicellular animals. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 2, n. 6, p. 918–925, 1992.

XIAO, J.H. *et al.* Molecular approaches to identify cryptic species and polymorphic species within a complex community of fig wasps. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15067, 2010.

XU, Baohong *et al.* Complete mitochondrial genome of *Brochis multiradiatus*. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 5, n. 1, p. 646-647, 2020.

ZACHOS, F. E. (New) Species concepts, species delimitation and the inherent limitations of taxonomy. **Journal of genetics**, v. 97, p. 811–815, 2018.

ZAREI, F. *et al.* Phylogeography and population structure of *Ponticola gorlap* (Teleostei: Gobiidae) in an evolutionary distinctive and ecologically threatened Caspian Sea sub-basin. **Aquatic Sciences**, v. 85, n. 1, p. 1–13, 2023.

ZHANG, J. *et al.* A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869–2876, 2013.

ZHANG, H.; GAO, L.; ZHANG, W. First complete mitochondrial genome of the *Corydoras pygmaeus* (Actinopteri: Callichthyidae) and its phylogenetic implications. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 7, n. 9, p. 1688-1690, 2022.

ZHANG, K. *et al.* Characterization of the complete mitochondrial genome of *Macrotocinclus affinis* (Siluriformes; Loricariidae) and phylogenetic studies of Siluriformes. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 1, p. 677–689, 2021.

ZHANG, R. *et al.* Complete mitochondrial genomes of two catfishes (Siluriformes, Bagridae) and their phylogenetic implications. **ZooKeys**, v. 1115, p. 103–116, 2022.

**ANEXO 1 ANNOTATION OF THE COMPLETE MITOCHONDRIAL
GENOME OF A *Scleromystax barbatus***

TABLE 31 – Annotation of the complete mitochondrial genome of a *Scleromystax barbatus* individual belonging to the AE population.

Gene	Strand	Position		Length(bp)	Codon	
		Start	End		Start	Stop
tRNA-Phe	H	1	68	68		
12S rRNA	H	69	1016	948		
tRNA-Val	H	1017	1088	72		
16S rRNA	H	1089	2758	1670		
tRNA-Leu	H	2759	2833	75		
ND1	H	2834	3805	972	ATG	TAG
tRNA-Ile	H	3814	3885	72		
tRNA-Gln	L	3884	3954	71		
tRNA-Met	H	3954	4023	70		
ND2	H	4024	5068	1045	ATG	T--
tRNA-Trp	H	5069	5139	71		
tRNA-Ala	L	5141	5209	69		
tRNA-Asn	L	5211	5283	73		
tRNA-Cys	L	5314	5379	66		
tRNA-Tyr	L	5379	5448	70		
COI	H	5450	7009	1560	GTG	AGG
tRNA-Ser	L	6997	7067	71		
tRNA-Asp	H	7072	7141	70		
COII	H	7146	7836	691	ATG	T--
tRNA-Lys	H	7837	7910	74		
ATPase 8	H	7912	8079	168	ATG	TAA
ATPase 6	H	8070	8753	684	ATG	TAA
COIII	H	8772	9555	784	ATG	T--
tRNA-Gly	H	9556	9627	72		
ND3	H	9628	9976	349	ATG	T--
tRNA-Arg	H	9977	10046	70		
ND4L	H	10047	10343	297	ATG	TAA
ND4	H	10337	11717	1381	ATG	T--
tRNA-His	H	11718	11787	70		
tRNA-Ser	H	11788	11854	67		
tRNA-Leu	H	11856	11928	73		
ND5	H	11929	13755	1827	ATG	TAA
ND6	L	13752	14267	516	ATG	TAA
tRNA-Glu	L	14268	14336	69		
Cyt b	H	14339	15476	1138	ATG	T--
tRNA-Thr	H	15477	15548	72		
tRNA-Pro	L	15547	15616	70		
D-loop	H	15617	16651	1035		

Fonte: O autor (2023).

TABLE 32 – Annotation of the complete mitochondrial genome of a *Scleromystax barbatus* individual belonging to the PE population.

Gene	Strand	Position		Length(bp)	Codon	
		Start	End		Start	Stop
tRNA-Phe	H	1	68	68		
12S rRNA	H	69	1016	948		
tRNA-Val	H	1017	1088	72		
16S rRNA	H	1089	2759	1671		
tRNA-Leu	H	2760	2834	75		
ND1	H	2835	3806	972	ATG	TAG
tRNA-Ile	H	3815	3886	72		
tRNA-Gln	L	3885	3955	71		
tRNA-Met	H	3955	4024	70		
ND2	H	4025	5069	1045	ATG	T--
tRNA-Trp	H	5070	5140	71		
tRNA-Ala	L	5142	5210	69		
tRNA-Asn	L	5212	5284	73		
tRNA-Cys	L	5315	5380	66		
tRNA-Tyr	L	5380	5449	70		
COI	H	5451	7010	1560	GTG	AGG
tRNA-Ser	L	6998	7068	71		
tRNA-Asp	H	7073	7142	70		
COII	H	7147	7837	691	ATG	T--
tRNA-Lys	H	7838	7911	74		
ATPase 8	H	7913	8080	168	ATG	TAA
ATPase 6	H	8071	8754	684	ATG	TAA
COIII	H	8773	9556	784	ATG	T--
tRNA-Gly	H	9557	9628	72		
ND3	H	9629	9977	349	ATG	T--
tRNA-Arg	H	9978	10047	70		
ND4L	H	10048	10344	297	ATG	TAA
ND4	H	10338	11718	1381	ATG	T--
tRNA-His	H	11719	11788	70		
tRNA-Ser	H	11789	11855	67		
tRNA-Leu	H	11857	11929	73		
ND5	H	11930	13756	1827	ATG	TAA
ND6	L	13753	14268	516	ATG	TAA
tRNA-Glu	L	14269	14337	69		
Cyt b	L	14340	15477	1138	ATG	T--
tRNA-Thr	H	15478	15549	72		
tRNA-Pro	L	15548	15617	70		
D-loop	H	15618	16614	997		

Fonte: O autor (2023).

TABLE 33 – Annotation of the complete mitochondrial genome of a *Sleromystax barbatus* individual belonging to the PS population.

Gene	Strand	Position		Length (bp)	Codon	
		Start	End		Start	Stop
tRNA-Phe	H	1	68	68		
12S rRNA	H	69	1016	948		
tRNA-Val	H	1017	1088	72		
16S rRNA	H	1089	2756	1668		
tRNA-Leu	H	2757	2831	75		
ND1	H	2832	3803	972	ATG	TAG
tRNA-Ile	H	3812	3883	72		
tRNA-Gln	L	3882	3952	71		
tRNA-Met	H	3952	4021	70		
ND2	H	4022	5066	1045	ATG	T--
tRNA-Trp	H	5067	5137	71		
tRNA-Ala	L	5139	5207	69		
tRNA-Asn	L	5209	5281	73		
tRNA-Cys	L	5312	5377	66		
tRNA-Tyr	L	5377	5446	70		
COI	H	5448	7007	1560	GTG	AGG
tRNA-Ser	L	6995	7065	71		
tRNA-Asp	H	7070	7139	70		
COII	H	7144	7834	691	ATG	T--
tRNA-Lys	H	7835	7908	74		
ATPase 8	H	7910	8077	168	ATG	TAA
ATPase 6	H	8068	8751	684	ATG	TAA
COIII	H	8770	9553	784	ATG	T--
tRNA-Gly	H	9554	9625	72		
ND3	H	9626	9974	349	ATG	T--
tRNA-Arg	H	9975	10044	70		
ND4L	H	10045	10341	297	ATG	TAA
ND4	H	10335	11715	1381	ATG	T--
tRNA-His	H	11716	11785	70		
tRNA-Ser	H	11786	11852	67		
tRNA-Leu	H	11854	11926	73		
ND5	H	11927	13753	1827	ATG	TAA
ND6	L	13750	14265	516	ATG	TAA
tRNA-Glu	L	14266	14334	69		
Cyt b	H	14337	15474	1138	ATG	T--
tRNA-Thr	H	15475	15546	72		
tRNA-Pro	L	15545	15614	70		
D-loop	H	15615	16693	1079		

Fonte: O autor (2023).

