



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**FILOGEOGRAFIA DE *Parotocinclus cristatus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE)
DE BACIAS COSTEIRAS DA BAHIA**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
JOÃO LENO PEREIRA DE SOUSA
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Jequié-BA
2017

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



JOÃO LENO PEREIRA DE SOUSA

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
**FILOGEOGRAFIA DE *Parotocinclus cristatus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE)
DE BACIAS COSTEIRAS DA BAHIA**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do Título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação, com ênfase em Genética (GEN) e Biodiversidade e Conservação (BC).

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso
Co-orientadora: Dra. Jamille de Araújo Bitencourt

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



**Jequié-BA
2017**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



S725f Sousa, João Leno Pereira de.

Filogeografia de *Parotocinclus cristatus* (siluriformes, loricariidae) de Bacias Costeiras da Bahia / João Leno Pereira de Sousa.- Jequié, 2017.
94f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso e da Coorientadora Prof^ª. Dra. Jamille de Araújo Bitencourt)

1. Barcode 2. Espécies Crípticas 3. Marcador Molecular 4. Cascudo 5. Bacias do Leste I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título

CDD – 596

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié





UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Campus Jequié-BA

Genética

ção

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Filogeografia de *Parotocinclus cristatus* (Siluriformes, Loricariidae) de bacias costeiras da Bahia”.

Autor (a): João Leno Pereira de Sousa

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso - UESB/Jequié-BA

Prof. Dr. Horácio Schneider – UFPA/Belém-PA

Prof^a. Dr^a Maria Iracilda da Cunha Sampaio - UFPA/Belém-PA

Genética

ção

Data de realização: 31 de agosto de 2017.

Avenida José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho – Jequié/BA – CEP 45.206-190.
Telefones: (0**73) 3528-9725 – E-mail: ppggc@uesb.edu.br





AGRADECIMENTOS

O período dessa pós-graduação representou um trampolim para o meu crescimento pessoal e profissional. Sem um número considerável de pessoas e o suporte técnico encontrado certamente essa qualificação profissional não seria possível.

A Deus, à família por constituírem o meu pilar estrutural. Aos amigos de longa data, em especial, aos PTTs (Polly, Tiana, Lane) pela parceria. Aos amigos Regi, Nilma, Patrícia, Jaque, Tânia, Zene e Ramon, pelo apoio. Um agradecimento especial a Victor, Sheila (e família) e Luzitânia, companheiros nos desafios, nas alegrias, no crescimento, e acima de tudo, pela reciprocidade e amizade sincera.

A todos que, além da amizade, compuseram o suporte técnico/científico. Ao Alexandre que foi o mediador para que tudo isso se concretizasse, incentivando, apresentando e auxiliando nas atividades de rotina no laboratório. Ao André Teixeira pelas dicas de coleta e identificação. À Márcia, onipresente nas coletas e sempre disposta a ajudar e discutir os dados. Aos colegas Leandro, Silvia, Sâmela pelo apoio nas análises. À prof^ª. Débora e Ricardo pela amizade, apoio e colaboração. Estendo ainda para os todos os demais colegas dos laboratórios de citogenética e molecular.

À Prof^ª. Luisa Maria Sarmiento-Soares e Gabriel Costa e Silva pela colaboração nas identificações.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC) pelo suporte estrutural e apoio.

À Universidade Federal do Pará (UFPA) pela crucial parceria no processo do sequenciamento.

Aos meus orientadores, Paulo Affonso e Jamille Bitencourt por serem modelos de profissionais éticos e comprometidos, sempre acessíveis e disponíveis e por terem mediado esse novo mundo de conhecimento para mim.





BIOGRAFIA

João Leno Pereira de Sousa nasceu em 17/10/1989 na cidade de Piripiri no Estado do Piauí. Possui graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (2014). A monografia intitulada “Um diálogo entre evolução, ciência e sociedade: análise de uma sequência didática para o ensino de evolução” foi apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso. Atualmente é aluno do Programa de Mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação. Apresenta interesse em pesquisa nas áreas de Biologia Molecular e Evolução.



RESUMO

A tribo Otothyriini (Siluriformes: Loricariidae: Hypoptopomatinae) é representada por pequenos cascudos bentônicos com recorrentes rearranjos taxonômicos. O gênero mais diverso dessa tribo é *Parotocinclus*, com 31 espécies descritas até o momento, das quais, três são descritas para bacias costeiras da Bahia, nordeste do Brasil. Dentre elas, a espécie *Parotocinclus cristatus* foi descrita originalmente para a bacia do rio Almada com posterior distribuição ampliada para as bacias dos rios de Contas, Cachoeira e Una. No entanto, os critérios taxonômicos utilizados para delimitar a espécie são sutis, polimórficos e podem ser encontrados em táxons distintos. Adicionalmente, a ausência de dados moleculares dificulta o entendimento dos padrões biogeográficos nas bacias costeiras do leste do Brasil, região de elevado endemismo e insuficiente conhecimento biológico. Nesse sentido, a taxonomia controversa, a distribuição restrita e aparente comportamento filopátrico tornam esse grupo de peixes ideal para estudos taxonômicos, filogenéticos e filogeográficos. Assim, o objetivo do trabalho foi inferir a distribuição espaço-temporal das linhagens de *P. cristatus* das bacias costeiras da Bahia, investigando as relações evolutivas, possível presença de formas crípticas e padrões filogeográficos. Para isso, foram analisadas sequências de dois genes mitocondriais (COI e Cytb) e um nuclear (Rodopsina) de populações coletadas nas quatro bacias descritas como áreas de ocorrência da espécie. Os dados moleculares, especialmente aqueles baseados em DNA barcode e métodos de reconstrução filogenética evidenciaram que o táxon denominado *P. cristatus* constitui um complexo de espécies crípticas, composta por três MOTUs altamente divergentes. Os filogrupos detectados revelaram que as populações das bacias dos rios Cachoeira e Una constituem uma única MOTU com divergência no Plioceno, acumulando profundas diferenças genéticas em relação às linhagens das demais bacias. Por outro lado, observou-se que as MOTUs das bacias dos rios Almada e Contas, respectivamente, apresentaram divergência mais recente. Ainda, as populações da bacia do rio Almada estão altamente estruturadas entre os trechos baixos e superiores, indicando restrições ao fluxo gênico dentro de um mesmo sistema fluvial, aparentemente seguindo o modelo de *stepping stone*. Esse padrão biogeográfico surpreendente, no qual bacias contíguas (Cachoeira e Almada) apresentam grupos geneticamente mais divergentes entre si que outras hipoteticamente menos relacionadas (Contas e Almada) sinalizam uma história evolutiva complexa, possivelmente relacionada a inúmeros eventos de capturas de cabeceira. O conjunto dos dados apresentou diversidade críptica desses cascudos, com linhagens únicas em área sem proteção legal. Por fim, sugere-se cautela nas inferências biogeográficas da ictiofauna Neotropical com base em espécies pouco delimitadas e que desconsiderem a história das paleodrenagens.

Palavras-chave: Barcode, Espécies Crípticas, Marcador Molecular, Cascudo, Bacias do Leste.



ABSTRACT

The tribe Otothyriini (Siluriformes: Loricariidae: Hypoptopomatinae) is represented by benthic small-sized armored catfishes of recurrent taxonomic rearrangements. *Parotocinclus* is the most diversified genus in this tribe, encompassing 31 valid species so far, three of them recognized for the coastal basins in Bahia, northeastern Brazil. Among them, *Parotocinclus cristatus* was originally described for the Almada River basin, followed by further range expansion to Contas, Cachoeira and Una River basins. Nonetheless, the taxonomic criteria to discriminate these species are subtle, polymorphic and usually present in distinct taxa. In addition, the lack of molecular data hinder the understanding about the biogeography patterns in coastal basins of Eastern Brazil, a region of high endemism rate and poor biological knowledge. Therefore, the controversial taxonomy, the restricted range and the apparent philopatric behavior of this fish group indicate they represent a suitable model for taxonomic, phylogenetic and phylogeographic studies. Hence, the goal of this work was to infer the spatial-temporal distribution of *P. cristatus* lineages throughout the coastal basins of Bahia, evaluating their evolutionary relationships, putative presence of cryptic forms and phylogeographic patterns. For that, sequences of two mitochondrial (COI and Cytb) and one nuclear (Rhodopsin) genes were analyzed from populations in the four basins in which this species is reported. The molecular data, particularly the DNA barcode analysis and phylogenetic reconstruction methods showed that the taxon named as *P. cristatus* comprises a complex of cryptic species, composed of three highly divergent MOTUs. The detected phylogroups revealed that the populations from Cachoeira and Una River basins represent a unique MOTU with differentiation during Pliocene, thus accumulating deep genetic divergence in relation to the lineages from the other basins. On the other hand, the MOTUs from Almada and Contas River basins, respectively, had a more recent differentiation between each other. Moreover, the populations from Almada River basin are highly structured between lower and higher portions, indicating restrictions to gene flow within a single riverine system, apparently in agreement with stepping stone model. The unusual biogeographic pattern in which nearby basins (Cachoeira and Almada) harbor highly divergent groups when compared to hypothetically less related systems (Contas and Almada) indicates a complex evolutionary history, putatively related to several events of headwater capture. The present dataset revealed cryptic diversity in this group of catfishes with unique evolutionary units in unprotected areas. In conclusion, caution is recommended to biogeographic inferences of Neotropical ichthyofauna based on poorly defined species and neglected history background of paleodrainages.

Keywords: Barcode, Cryptic Species, Molecular Markers, “Cascudo”, Eastern Brazil.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da Região Hidrográfica Atlântico Leste e suas sub-bacias. Fonte: ANA (2015). 17
- Figura 2.** Mapa da bacia do Rio de Contas. 19
- Figura 3.** Mapa da localização da bacia do Leste. Fonte: De Paula *et al.* (2014). 20
- Figura 4.** Filogenia de Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Otothyrinae calibrada a partir da origem dos Siluriformes (120 Ma) e Callichthyidae (55 Ma) mostrando a topologia da árvore analisada no BEAST a partir de 155 espécimes de 113 espécies Loricariidae. Adaptado. Fonte: Roxo *et al.* (2014). 32
- Figura 5.** Cladograma à esquerda ilustrando o tamanho máximo estimado do corpo ancestral (MBS), construído com base em uma filogenia calibrada no tempo de Hypoptopomatinae, incluindo as tribos Hypoptopomatini (H), Neoplecostomini (N) e Otothyriini (O). As cores do ramo correspondem às estimativas de MBS (vermelho indicando menor e verde indicando maior). À direita, o cladogramilustrando as estimativas do habitat ancestral para a subfamília Hypoptopomatinae. Fonte: Roxo *et al.* (2017). 34
- Figura 6.** Modelos de rearranjo de drenagem via pirataria de fluxo (captura). A linha tracejada é a divisão de drenagem; (A) ilustra captura por erosão regressiva levando ao recuo de uma das cabeceiras; (B) e (C) ilustram a captura por aplanamento lateral de uma bacia de drenagem adjacente por recuo de uma cabeceira (B) ou captura de drenagem lateral (C) de um tributário adjacente. Fonte: Bishop (1995). 37
- Figura 7.** Ecorregião da Mata Atlântica Nordeste e agrupamentos ictiofaunísticos. Os números representam as ecorregiões de água doce adjacentes: (327) São Francisco, (329) Paraíba do Sul e (344) Alto Paraná. Adaptado. Fonte: Camelier e Zanata (2014). 38
- Figura 8.** Exemplar de *Parotocinclus cristatus* coletado na bacia do Rio Almada. Canto inferior direito mostra o tufo de cristas na placa occipital, um dos caracteres diagnósticos da espécie. 41
- Figura 9.** Mapa das bacias hidrográficas (Contas, Almada, Cachoeira e Una) com fotos das localidades amostradas de *Parotocinclus cristatus*. 43
- Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose para quantificação de DNA genômico. 44
- Figura 11.** Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) da amplificação de fragmentos de Cytb (a), Rodopsina (b) e COI (c) em amostras de *Parotocinclus cristatus*. 45
- Figura 12.** Árvore representativa baseada em NJ das sequências do COI das amostras coletadas e espécies afins. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade

(>60%) pelos métodos de NJ, ML e BI, respectivamente. As colunas indicam os resultados dos algoritmos de delimitação de espécie..... 56

Figura 13. Topologia recuperada pelo método de ML e BI baseados nas sequências mitocondriais do gene Cytb dos espécimes amostrados e espécies afins. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade (>60%) pelos métodos de ML e BI, respectivamente. 58

Figura 14. Topologia recuperada pelo método de ML e BI baseados nas sequências mitocondriais do gene Rodopsina dos espécimes amostrados. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade (>60%) pelos métodos de ML e BI, respectivamente. . 59

Figura 15. Estimativas do tempo (em milhões de anos) para a divergência de *Parotocinclus cristatus* e diversificação de seus quatro haplogrupos. Os ramos dentro de cada haplogrupos são colapsados. O haplogrupos azul representa os indivíduos coletados na bacia do rio de Contas, o haplogrupos em ocre indica as amostras do alto e médio Almada, enquanto os haplogrupos verde e lilás representam as populações do baixo Almada e das bacias Cachoeira+Una. Os valores de probabilidade posteriores são mostrados acima dos nós. A barra azul indica intervalos de confiança de 95%. 60

Figura 16. Localidades amostradas de *P. cristatus* e rede de haplótipos para os genes mitocondriais e nucleares. A) Rede de haplótipos baseada em 589 pb do COI. B) Rede de haplótipos baseada em 835 pb do Cytb. C) Rede de haplótipos baseada em 473 pb da Rodopsina. Nas redes, cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho representa sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos que diferem em uma mutação. Traços nas linhas representam mutações adicionais. As cores representam as localidades. 62

Figura 17. Análise de variância molecular espacial (SAMOVA). Estimativa de valores dos índices de fixação obtidos para o melhor agrupamento em cada k testado para o COI (A) e Cytb (B). O mapa em cada um dos gráficos reflete a configuração final que melhor representa o número de K após 1000 simulações de partições diferentes. 64

Figura 18. Análise Bayesiana da Estrutura Populacional (BAPS) baseado no gene COI (A) e Cytb (B). As cores representam clusters e a localidades estão representadas abaixo. 65

Figura 19. Teste de Mantel a partir de sequências de COI (A, C) e Cytb (B, D) para todo o conjunto de dados (A, B) e para as localidades da bacia do rio Almada (C, D). 66

Figura 20. Estimativas do *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) para os filogrupos mitocondriais (COI+Cytb): A) Contas; B) Cachoeira+Una; C) Baixo Almada; D) Alto+Médio Almada. A linha do meio representa a mediana da estimativa, e as linhas superior e inferior

indicam os limites acima e abaixo de 95% de HPD (Highest Posterior Density), respectivamente. O eixo Y está em escala logarítmica. O eixo X representa milhares de anos.



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos pontos de coleta. N (número de amostras); Prof. (profundidade); Veloc. (velocidade).....	42
Tabela 2. Número de sequências utilizadas para cada marcador por ponto de coleta. N (número de sequências utilizadas).....	46
Tabela 3. Lista de sequências de espécies de <i>Parotocinclus</i> , gêneros relacionados da subfamília Otothyridae e espécies de Loricariidae selecionadas como gupo externo obtidas no banco de dados BOLD e <i>GenBank</i>	47
Tabela 4. Classificação dos valores de divergência (F_{ST}) proposta por Wright (1978).	50
Tabela 5. Distâncias genéticas intraespecíficas (D) e erro-padrão (S.E.) utilizando dados do COI baseados no modelo K2P.....	53
Tabela 6. Distância genética par-a-par entre amostras de <i>P. cristatus</i> por localidade a partir de dados das sequências de COI com base no modelo K2P (diagonal inferior: valores de distância; diagonal superior: desvio padrão).	53
Tabela 7. Distância genética interpopulacional e interespecífica nas sequências de COI baseados no modelo K2P. Diagonal inferior: comparações par-a-par entre os espécimes coletados por localidade e outras espécies <i>Parotocinclus</i> e gêneros relacionados disponíveis no BOLD. Diagonal superior: desvio padrão.	54
Tabela 8. Resultado da análise de <i>Cluster</i> mostrando as Distâncias de <i>Nearest Neighbor</i> (NN) para cada OTU estimada.....	55
Tabela 9. F_{ST} para a par entre as localidades amostradas baseado em 589 pb do COI. . ^{NS} : não significativo; * $p \leq 0,05$	63
Tabela 10. F_{ST} para a par entre as localidades amostradas baseado em 835 pb do Cytb. ^{NS} : não significativo; * $p \leq 0,05$	63
Tabela 11. Análise da Variância Molecular (AMOVA) entre os filogrupos Contas, Almada e Cachoeira+Una. GL: Grau de liberdade; * $p \leq 0,05$	64
Tabela 12. Parâmetros genéticos populacionais de COI e Cytb estimados para os filogrupos. N=Número de indivíduos; NH=Número de haplótipos; Hd=diversidade haplotípica; π =diversidade nucleotídica. ^{ns} : não significativo. * $p \leq 0,05$	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ABGD - <i>Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation</i>	Hd - diversidade haplotípica
AIC - <i>Akaike Information Criterion</i>	iBOL - <i>International Barcode of Life</i>
BAPS - <i>Bayesian Analysis of Genetic Population Structure</i>	INMA - Instituto Nacional da Mata Atlântica
BI - Inferência Bayesiana	K2P - Kimura 2 parâmetros
BINS - <i>Barcode Index Numbers</i>	MANOVA - Análise Multivariada da Variância
BLAST - <i>Basic Alignment Search Tool</i>	ML - Máxima verossimilhança
BOLD - <i>Barcode of Life Data System</i>	MOTUs - Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares
bPTP - <i>Bayesian implementation of the PTP</i>	MrBayes - <i>Bayesian Inference of Phylogeny</i>
CBOL - <i>Consortium for the Barcode of Life</i>	mtDNA - DNA mitocondrial
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais	NCBI - National Center for Biotechnology Information
CIPRes - <i>Cyber Infrastructure for Phylogenetic Research</i>	NCBI - <i>National Center for Biotechnology Information</i>
COI - Citocromo C Oxidase - subunidade I	NJ - <i>Neighbor-joining</i>
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente	NN - NEAREST NEIGHBOR - Vizinho Próximo
DNA - Ácido desoxirribonucléico	OTUs - Unidades Taxonômicas Operacionais
DNASP - <i>DNA Sequence Polymorphism</i>	PhyML - <i>Maximum Likelihood Phylogenies</i>
dNTP - <i>deoxyribonucleotide triphosphates</i> - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados	RESL - <i>Refined Individual Linkage</i>
EBSP - <i>Extended Bayesian Skyline Plot</i>	SAMOVA - Análise da Variância Molecular
ESS - <i>Effective Sample Size</i>	SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
FISH-BOL - <i>Fish Barcode of Life Initiative</i>	Taq DNA - <i>Thermus aquaticus DNA polimerase</i>
F_{ST} - Índice de Fixação Total	
F_{CT} - Índice de Fixação Entre Grupos	
GenBank - <i>Genoma Bank</i>	
GMYC - <i>General Mixed Yule Coalescent</i>	



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. Considerações sobre a Região hidrográfica Atlântico Leste	17
2.1.2. Bacia do rio de Contas	18
2.1.3. Bacias do Leste (bacias do rio Almada, Cachoeira e Una)	19
2.2. Marcadores moleculares e filogeografia	23
2.3. DNA <i>barcode</i>	25
2.4. Aspectos filogeográficos em peixes de bacias hidrográficas brasileiras	28
2.5. Família Loricariidae como modelo para estudos filogeográficos	30
2.6. Biogeografia histórica das drenagens costeiras do leste do Brasil	35
3. OBJETIVO GERAL	39
3.1. Objetivos específicos	39
4. METODOLOGIA	40
4.1. Coleta de material	40
4.2. Identificação morfológica	40
4.2. Extração de DNA total	44
4.3. Amplificação de fragmentos de DNA	44
4.4. Sequenciamento de DNA	45
4.5. Análise das sequências: edição e alinhamento	45
4.6. Análise de DNA <i>Barcode</i>	48
4.7. Análises filogenéticas e estimativa de tempo de divergência	49
4.8. Análises populacionais e filogeográficas	50
4.8.1. Estimativas de estrutura genética	50
4.8.2. Parâmetros populacionais e análises de demografia histórica	51
5. RESULTADOS	52
5.1. Identificação morfológica	52
5.2. Análise de DNA <i>barcode</i>	52
5.3. Análises filogenéticas e estimativa de tempo de divergência	57
5.4. Análises populacionais e filogeográficas	60
5.5. Estimativas de estrutura genética	60
5.6. Parâmetros populacionais e análises de demografia histórica	66
6. DISCUSSÃO	69

6.1. Aspectos taxonômicos e filogenéticos.....	69
6.2. Aspectos filogeográficos	71
7. CONCLUSÕES.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
9. ANEXO 1. Espécies recuperadas pelo método ABGD	91
10. ANEXO 2. Espécies recuperadas pelo método GMYC.....	92
11. ANEXO 3. Espécies recuperadas pelo método bPTP.....	93
12. ANEXO 4. Fotointerpretação do padrão das drenagens das bacias do Contas, Almada, Cachoeira e Una (Norte – Sul, respectivamente). Círculos amarelos destacam anomalias (meandramentos) e círculos vermelhos as curvaturas abruptas (cotovelos).....	94



1. INTRODUÇÃO

A região neotropical abriga a maior diversidade de peixes de água doce do mundo e tem sido alvo de inúmeros estudos biogeográficos (Albert & Reis, 2011). Grande parte dessa diversificação na América do Sul está relacionada com a separação dos continentes, a história geomorfológica das bacias hidrográficas e com incursões marinhas sobre o continente no final do Cretáceo e do Cenozóico (Lundberg *et al.*, 1998; Ribeiro, 2006). Tais eventos de vicariância e divergência alopátrica com alterações nos sistemas de captação resultaram na notável riqueza ictiofaunística dessa região, com destaque para o Brasil.

Exclusivamente Neotropical, a família Loricariidae (cascudos ou acaris) é uma das maiores e mais diversificadas famílias de teleósteos, com mais de 900 espécies (Lujan *et al.*, 2015). Porém, ainda é escasso o entendimento dos mecanismos de diversificação espaço-temporal dos loricarídeos. Aparentemente, os ciclos de transgressões e regressões marinhas podem ter exercido grande impacto nas linhagens costeiras, favorecendo a especiação ao longo das inúmeras bacias que deságuam no Atlântico (Roxo *et al.*, 2014). Adicionalmente, vários táxons endêmicos dessa família são encontrados em cabeceiras, o que tem sido atribuído ao pequeno porte e consequente dispersão limitada dos peixes desses ambientes, condições favoráveis à especiação alopátrica mesmo dentro de bacias (Castro, 1999).

Dentre os diversos representantes de Loricariidae encontrados em rios costeiros da Bahia, *Parotocinclus cristatus*, conhecido popularmente cascudinho, chupa-pedra ou limpa-vidro, é uma das espécies mais abundantes e típicas de pequenos riachos, com ocorrência nas bacias costeiras dos rios de Contas, Almada, Cachoeira e Una. O pequeno porte, a baixa vagilidade e distribuição restrita tornam essa espécie um promissor modelo para estudos filogeográficos. A utilização de marcadores moleculares nesse tipo de análise, conforme previsto, garante que sejam obtidas informações refinadas sobre a estrutura das populações e eventual diversidade críptica, permitindo inferir a história evolutiva desse grupo bem como das bacias hidrográficas associadas.

Dados dessa natureza são inéditos para a ictiofauna endêmica regional do estado da Bahia. De fato, a região abrangida nesse projeto constitui uma área reconhecida como de provável importância biológica, mas insuficientemente conhecida (Cetra *et al.*, 2010) e com grandes ameaças antrópicas relacionadas ao desmatamento, introdução de espécies alóctones e mau uso dos recursos hídricos (Nogueira *et al.*, 2010). Assim, o presente trabalho também está alinhado com a conservação da biodiversidade a partir da potencial descrição de linhagens evolutivas distintas em áreas não devidamente protegidas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Considerações sobre a Região hidrográfica Atlântico Leste

A área de ocorrência da espécie *Parotocinclus cristatus* está inserida na Região Hidrográfica Atlântico Leste (Figura 1). Essa região é formada por um conjunto de bacias hidrográficas costeiras que drenam para o Oceano Atlântico com área total de 388.160 km², distribuídas em quatro estados: Bahia (69%); Minas Gerais (26%); Sergipe (4%) e Espírito Santo (1%). São reconhecidas oito unidades hidrográficas para o Atlântico Leste, denominadas Vaza Barris, Litorânea BA-SE, Itapicuru, Litorânea BA, Paraguaçu, Contas, Pardo - Jequitinhonha e Litorânea ES-BA (Figura 1). As principais drenagens são os rios Vaza-Barris, Barba do Tubarão, Real, Itapicuru-açu, Itapicuru, Inhambupe, Jacuípe, Salgado, Pojuca, Capivari, Paraguaçu, São João, Salto, Gavião, Congogi, Contas, Pardo, Itacambiruçu, Araçaí, Jequitinhonha, Prado ou Jucuruçu, Alcobaça ou Itanhaém, Mucuri, Cibrão e São Mateus (MMA, 2006; ANA, 2015).

A região apresenta heterogeneidade ambiental e climática no sentido leste-oeste, desde remanescentes de Mata Atlântica até ambientes secos e quentes, englobando grande parte do semiárido nordestino (MMA, 2006), com períodos críticos de estiagem (ANA, 2015). A densidade demográfica é de 38,82 hab./km², aproximadamente, duas vezes maior que a média brasileira (22,4 hab./km²). A seguir são apresentados detalhes sobre as bacias dos rios de Contas, Almada, Una e Cachoeira, áreas de região hidrográfica Atlântico Leste contempladas no presente estudo.

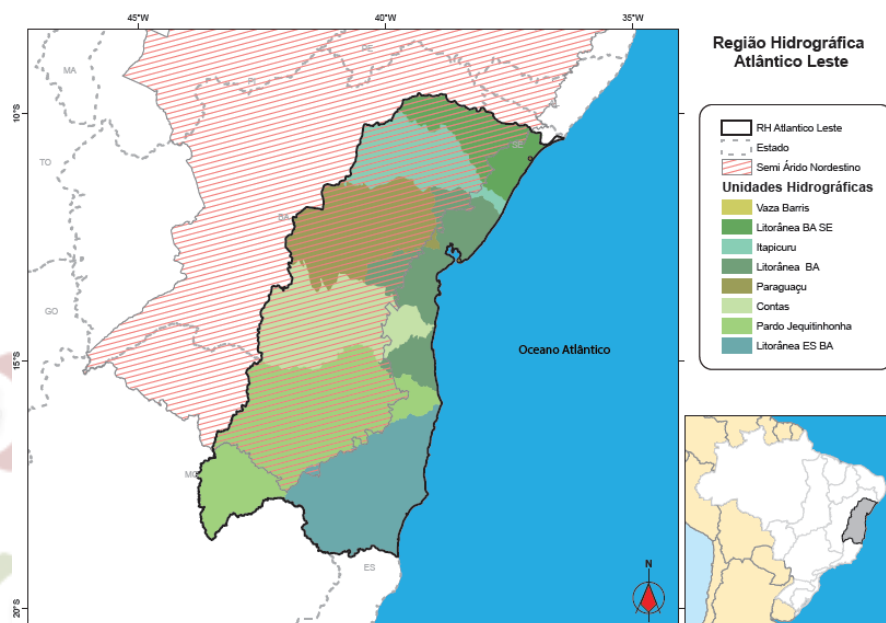


Figura 1. Mapa da Região Hidrográfica Atlântico Leste e suas sub-bacias. Fonte: ANA (2015).

2.1.2. Bacia do rio de Contas

A unidade hidrográfica da bacia do Rio de Contas é a maior bacia inteiramente situada no estado da Bahia, com uma área total de 55.483 km² na região centro-sul do estado. Essa bacia está limitada ao norte pelas bacias do rio Paraguaçu e Recôncavo Sul, a oeste pela bacia do rio São Francisco; a leste com o Oceano Atlântico e ao Sul com as bacias do rio Pardo e Leste (MMA, 2006; Severi *et al.*, 2010; INEMA, 2017) (Figura 2).

A área de drenagem do rio de Contas apresenta relevo variando de plano a escarpado e geologia complexa, sendo a maior parte das rochas do tipo granulitos do Complexo Cristalino Brasileiro. A vegetação na região de cabeceiras a oeste é predominantemente caatinga, enquanto a região média apresenta uma zona de transição entre mata Atlântica e caatinga até remanescentes das matas de cacau (cabruca) e mata Atlântica ao leste. O clima predominante é o semiárido (precipitação < 700 mm) mudando gradualmente no sentido Leste para úmido (precipitações ~ 2000 mm) (Filho, 1976; Teixeira *et al.*, 2012; INEMA, 2017).

A ictiofauna da bacia do rio de Contas apresenta uma similaridade faunística com a bacia do São Francisco (Severi *et al.*, 2010), resultado de prováveis eventos vicariantes entre ambas (Bizerril, 1994). As famílias mais representativas dessa fauna são: Characidae, Loricariidae, Sciaenidae, Cichlidae, Poecilidae, Prochilodontidae, Erythrinidae, Parodontidae, Gymnotidae, Curimatidae, Anostomidae e Callichthyidae (Severi *et al.*, 2010). Vale ressaltar que espécies introduzidas também são documentadas nessa região, tais como *Cichla monoculus*, *Metynnis maculatus*, *Plagioscion squamosissimus* e *Oreochromis niloticus* (Severi, *et al.*, 2010). Por outro lado, a bacia do rio de Contas possui registros de espécies endêmicas como *Cyphocharax pinnilepis* (Severi *et al.*, 2010), evidências de diversidade críptica (Bitencourt *et al.*, 2011; Medrado *et al.*, 2012; Medrado *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016) e espécies ainda não catalogadas (Cetra *et al.*, 2010; Camelier & Zanata, 2014). Adicionalmente, essa bacia representa a localidade-tipo de *Parotocinclus jimi* (Garavello, 1977).

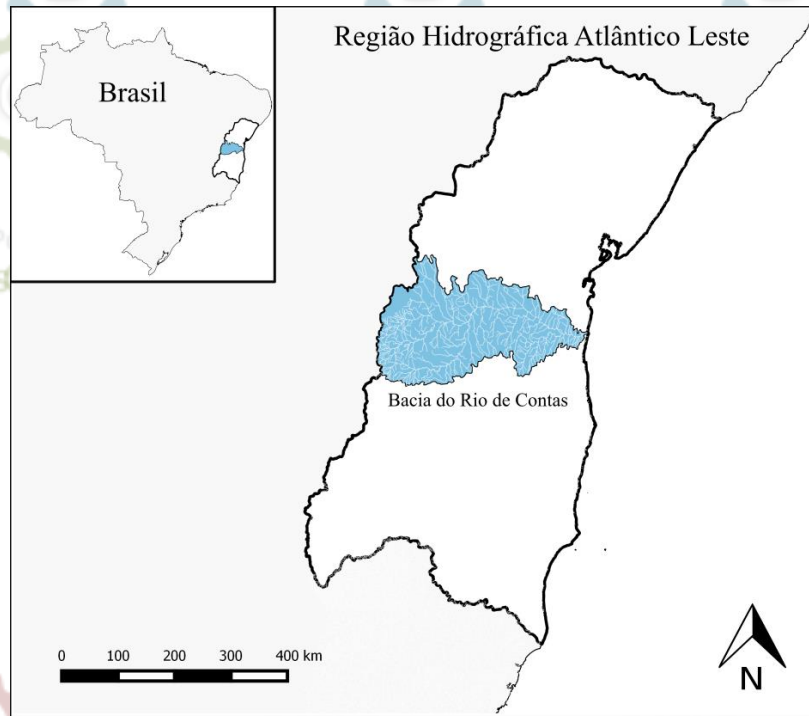


Figura 2. Mapa da bacia do Rio de Contas.

2.1.3. Bacias do Leste (bacias do rio Almada, Cachoeira e Una)

As bacias do Leste da Bahia representam um conjunto de pequenas drenagens litorâneas situadas no Estado da Bahia (Figura 3), limitadas entre as bacias do rio de Contas (ao norte), e Pardo (sul e oeste) e o Oceano Atlântico (leste). As principais drenagens dessa região são as bacias dos rios Almada, Cachoeira, Una e Doce (De Paula *et al.*, 2012; INEMA, 2017).

Em termos geológicos, essas bacias estão inseridas no Cráton do São Francisco (Proterozóico Superior) com substrato geológico formado por diferentes litotipos: granulitos (Arqueno), intrusões de rochas alcalinas, rochas sedimentares da bacia sedimentar Camamu-Almada e os sedimentos inconsolidados da formação Barreiras. A menos de 50 km do litoral existe uma depressão denominada de Depressão Itabuna-Itapetinga, a qual estabelece o clima subúmido a seco (Aw). Por outro lado, remanescentes de Mata Atlântica estão submetidos a um clima tropical quente e úmido, sem estação seca definida (Af). Em tais remanescentes, estão localizadas a Reserva Biológica Federal (REBIO) de Una, o Parque Nacional (PARNA) da Serra das Lontras e o Parque Estadual (PE) da Serra do Conduru (De Paula *et al.*, 2012).

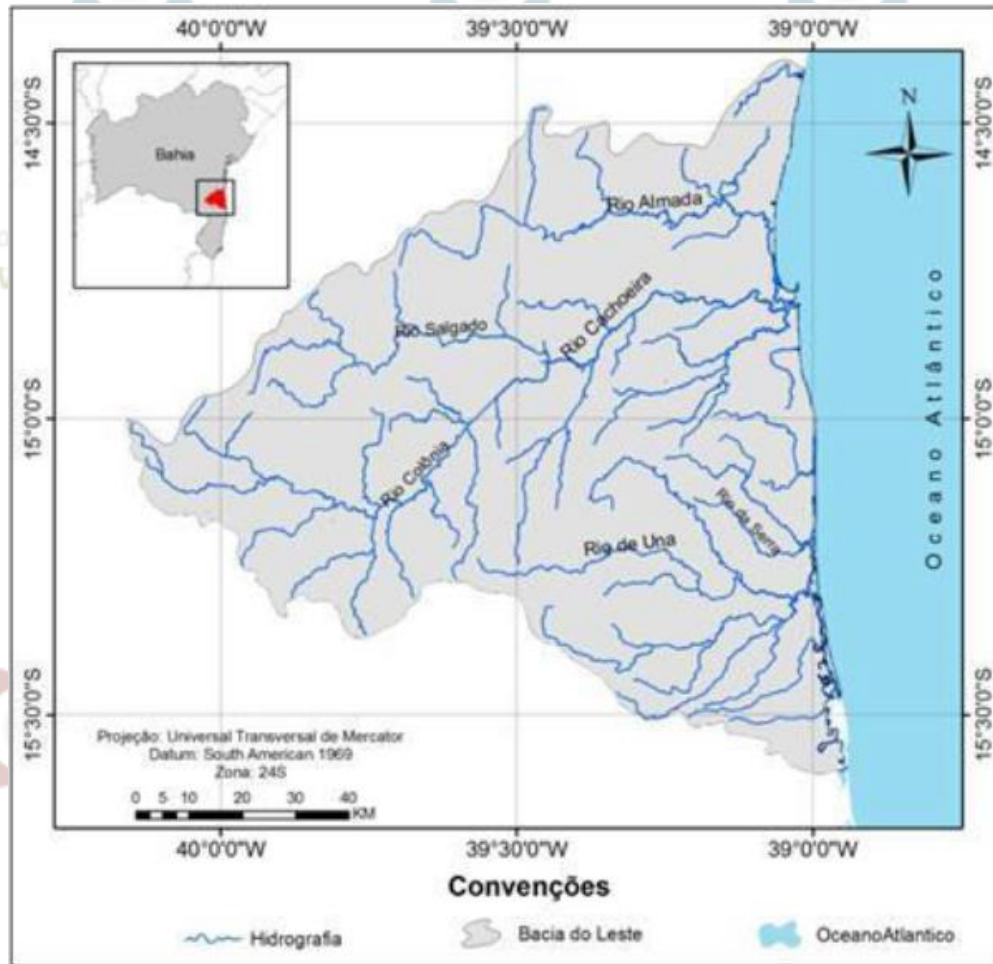


Figura 3. Mapa da localização da bacia do Leste. Fonte: De Paula *et al.* (2014).

A bacia hidrográfica do rio Almada é limitada ao norte e a oeste pela bacia do rio de Contas, ao sul pela bacia do rio Cachoeira e ao leste pelo Oceano Atlântico. Possui uma área de drenagem de aproximadamente 1.545 km² e uma extensão de 138 km desde sua nascente (serra do Chuchu, município de Almadina) até a sua foz em Barra de Itaípe, ao norte de Ilhéus (Filho, 1976; MMA, 2006).

A bacia integra a geotectônica do Cráton do São Francisco (Escudo Oriental da Bahia, pré-cambriano) e a Província Costeira e Margem Continental (bacias meso-cenozóicas). As bacias costeiras meso-cenozóicas tem origem associada ao sistema de *rifts* no Cretáceo Inferior (separação das placas Sul-Africanas e Americanas) (Netto & Sanches, 1991; Pereira, 2001). Filho (1976) destaca que o terço inferior da bacia (do litoral até a lagoa Encantada) é constituída de sedimentos cretáceos e aluviais mais recentes de constituição arenítica e calcífera, apresentando solo de alta porosidade e, portanto, muito permeável. O terço médio (lagoa Encantada a oeste de Itajuípe) é constituído de rochas granulíticas e do complexo cristalino e de baixa porosidade. Nessa zona ocorre uma grande falha na direção nordeste-

sudeste onde se encaixa o rio do Braço e o riacho Caldeiras. Por outro lado, o terço superior (a oeste de Itajuípe) é bastante acidentado e constituído por rochas granulíticas com várias e pequenas falhas que regulam a permeabilidade da zona.

Adicionalmente, cinco domínios geomorfológicos são caracterizados para a bacia hidrográfica do rio Almada, sendo que o domínio mais ao oeste é caracterizado pela presença de morros e serras com amplitudes que variam de 200 a 600 m e com rede de drenagens em forma de V. Por sua vez, o domínio mais representativo da área é a faixa rebaixada (depressão interplanáltica) com altitude de 40 a 120m e com interflúvios que se compõem em rampas de espraiamento e denudação. De forma geral, 66% da área da bacia apresentam declividade inferior a 20% (EMBRAPA, 2006; Franco *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012).

A taxa de precipitação é crescente no sentido oeste-leste da bacia e o clima apresenta três domínios: Af – clima tropical úmido (parte costeira), Am – clima de monção (parte central) e Aw – clima tropical com estação seca (parte oeste) (Franco *et al.*, 2011). A água da bacia apresenta baixos níveis de salinidade, pois o efeito de rochas alcalinas sobre a salinidade é balanceado pelo incremento do clima úmido no sentido leste (De Paula *et al.*, 2012).

Com base na caracterização da bacia algumas regiões de alta vulnerabilidade ambiental foram observadas. Por exemplo, a porção leste possui características do solo que o tornam suscetíveis à contaminação do lençol freático, escorregamentos e erosão, enquanto que as porções oeste e sudeste têm sofrido com o aumento de áreas de pastagens em detrimento de cobertura de cabruca e floresta (Gomes *et al.*, 2012).

Em relação à ictiofauna, muitas espécies consideradas inicialmente endêmicas para a bacia do rio Almada, tais como *Parotocinclus cristatus* (Garavello, 1977), *Lignobrycon myersi* (Miranda-Ribeiro, 1956) e *Gymnotus bahianus* (Menezes *et al.*, 2007) foram posteriormente registradas em bacias adjacentes, tais como Cachoeira e Contas (Schaefer, 2003; Castro & Jucá-Chagas, 2008; Rosa & Lima, 2008; Burger *et al.*, 2011; Camelier & Zanata, 2014). Ainda assim, alguns táxons ainda permanecem como de distribuição exclusiva para a bacia do rio Almada, como *Astyanax burgerai* (Zanata & Camelier, 2009).

Por sua vez, a bacia do rio Cachoeira localizada no centro-leste do estado da Bahia, possui drenagem de cerca de 422 km² sendo limitada pelas bacias dos rios de Contas, Almada Pardo, Una e pelo Oceano Atlântico. A principal nascente dessa pequena bacia está localizada no município de Itororó, serra do Ouricana (altitude de 800 metros), que dá origem ao rio Colônia. A partir da junção deste com o rio Salgado, a drenagem recebe o nome de rio Cachoeira até atingir a sua foz no oceano Atlântico (Ilhéus), percorrendo uma extensão total de 181 km (Filho, 1976; Nacif, 2000; MMA, 2006). A bacia agrupa os principais municípios

da região Sul da Bahia e constitui um importante sistema socioecológico (Nacif, 2000).

A bacia do rio Cachoeira está compreendida na borda sudeste do Cráton do São Francisco e a maior parte do seu território está inserida no Domínio Coaraci-Itabuna, enquanto o extremo sudeste da bacia, próximo ao litoral, encontra-se sob o domínio dos sedimentos terciários da formação Barreiras (Nacif, 2000). O padrão do relevo é diversificado, variando de Plano a Montanhoso, com predominância do tipo ondulado (Filho, 1976), sendo que elevação gradativa do terreno constitui o principal determinante das variações pluviométricas no sentido leste-oeste. De fato, ao longo da bacia é encontrada uma zonação climática que vai do clima Af (litoral- clima quente e úmido, precipitações anuais > 2.000 mm), clima Am (período seco nos meses de agosto a setembro, compensado pelos totais pluviométricos elevados) e clima Aw (oeste - clima tropical semi-úmido, precipitações anuais = 800 mm) (Nacif, 2000).

Nas regiões de cabeceira, a combinação de substratos granulíticos e o clima úmido resultam em águas com baixa salinidade. À medida que a drenagem corre em direção leste há o aumento da salinidade na água devido ao clima mais seco (região da Depressão Itabuna-Itapetinga) e ao substrato geológico (intrusões de rochas alcalinas e sienitos) (De Paula *et al.*, 2012). Quanto à cobertura vegetal, a parte superior da bacia é dominada por gramíneas com remanescentes de mata, seguida por cultivo de cacau, mata e pastagens e colimando como mangues e restingas na parte inferior (Filho, 1976, Oliveira, 1997).

Vale ressaltar que a bacia do rio Cachoeira está sob maior pressão urbana, agrícola e pecuária dentre as aqui representadas. A pecuária dominante no rio Salgado-Colônia e o lançamento de esgotos dos centros urbanos (principalmente em Itabuna e Ilhéus) tem aumentado o processo de eutrofização e marcado as drenagens com densos bancos de macrófitas flutuantes (De Paula *et al.*, 2012). Tais práticas levam à degradação ambiental e representam um grande risco à perda da biodiversidade ictiofaunística da região. Adicionalmente, a ictiofauna dessa bacia, predominantemente formada por peixes das ordens Characiformes e Siluriformes, possui número acentuado de espécies de táxons indefinidos (Cetra *et al.*, 2009, Trindade *et al.*, 2010) e ocorrência restrita de algumas espécies a ambientes preservados de cabeceiras, como *Trichomycterus* cf. *bahianus* e *Astyanax* aff. *taeniatus*, demonstrando a importância da preservação dessa região.

Por outro lado, espécies menos exigentes como *Parotocinclus cristatus*, *Characidium zebra*, *Poecilia vivipara*, *Hypostomus unae* e *Geophagus* cf. *itapicuruensis* parecem estar amplamente distribuídas na bacia do rio Cachoeira (Cetra *et al.*, 2009, Trindade *et al.*, 2010). Atestando isso, Cetra *et al.* (2009) constatou que os locais com baixos valores de velocidade

superficial e altos valores de temperatura, pH e condutividade apresentaram maiores valores de diversidade apesar do entorno degradado (pecuária, inexistência de mata ciliar, barragem). Vale destacar que *Parotocinclus cristatus* foi a espécie mais representativa em termos de ocorrência e abundância numérica (Cetra *et al.*, 2009).

Por fim, a bacia do rio Una (ou Aliança) localizada na porção Sul, possui perímetro total de 1.700 km² e está inteiramente contida nos Domínios da Mata Atlântica. Faz limite ao norte com a bacia do Cachoeira, ao sul com a bacia do rio Pardo, a oeste com a bacia do Cachoeira e Pardo e ao leste com o Oceano Atlântico. O rio Una possui nascente situada na Serra das Piabas, no município de Arataca (Filho, 1976).

O relevo é predominantemente do tipo montanhoso, forte ondulado a ondulado, sendo que este último predomina na parte central da bacia. É praticamente um rio encaixado em um vale, tornando-se planície ao leste até sua foz. Apresenta substrato geológico formado exclusivamente por granulitos e sedimentos da formação Barreiras com alta precipitação igualmente distribuída ao longo do ano (Filho, 1976). O clima e a geologia da bacia contribuem para a manutenção de uma água com baixíssima salinidade (De Paula *et al.*, 2012).

Quando comparada com as bacias do Almada e Cachoeira, a bacia do rio Una apresenta o melhor estado de conservação. A cobertura vegetal é preservada, com pouco impacto pecuário e abrangendo apenas quatro pequenas cidades. Contudo, os dados fluviométricos são escassos (De Paula *et al.*, 2012).

Camelier & Zanata (2014) registraram a ocorrência de espécies incluídas nas ordens Characiformes, Siluriformes e Cyprinodontiformes. Entre elas, destacam-se *Nematocharax venustus*, *Oligosarcus acutirostris* e *O. macrolepis*, *Pareiorhaphis bahianus*, *Otothyris travassosi*, *Parotocinclus cristatus* e *Phalloceros* sp. Análises biogeográficas a partir de composição da ictiofauna revelaram que as bacias dos rios Una, Cachoeira, Alma e Contas são estreitamente relacionadas e compartilham diversidades restritas a essas bacias (Camelier & Zanata, 2014).

2.2. Marcadores moleculares e filogeografia

A filogeografia constitui um ramo da biogeografia a partir do advento das técnicas moleculares, representando uma ciência multidisciplinar que estuda os princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens dentro e entre espécies relacionadas (Avice *et al.*, 1987; Avice, 2000). Assim, é possível relacionar informações de diferentes áreas do conhecimento para explicar a distribuição dos seres vivos sob a luz do entendimento de

mudanças atuais e passadas (Crisci *et al.*, 2003). Nesse sentido, os marcadores de DNA mitocondrial (DNAmT) merecem destaque, pois são amplamente utilizados tanto para estudos populacionais e filogeográficos como para inferências filogenéticas. As vantagens da aplicação de sequências de DNAmT em estudos dessa natureza incluem herança materna, ausência de eventos recombinacionais, existência de muitas cópias por célula, altas taxas de substituição de bases e maior estabilidade molecular em relação ao DNA nuclear (Bullerwell & Gray, 2004). Dentre as principais regiões mitocondriais utilizadas em estudos com animais para identificar e catalogar espécies e subespécies, reconstruir a história demográfica e a diversificação adaptativa destacam-se os genes Citocromo oxidase I (COI), Citocromo b (Cytb), região controle D-loop e HVS (Avise, 2000; Rosa & Paiva, 2009; Bueno-silva, 2012; Turchetto-zoleta *et al.*, 2013).

A informação genética desses marcadores é obtida por meio do sequenciamento de fragmentos de DNA (Sanger *et al.*, 1977), o qual permite inferir, entre outros aspectos, a distribuição geográfica de sequências variantes (haplótipos), denominada de análise filogeográfica (Avise *et al.*, 1985; Avise, 2000). Basicamente, três premissas norteiam a formulação desse tipo de estudo: (1) os diferentes ramos de uma genealogia correspondem a populações que são geograficamente estruturadas; (2) espécies que apresentam pouca estruturação populacional, isto é, populações geneticamente muito próximas, indicam alto fluxo gênico associado à alta dispersão com ausência de barreiras efetivas; e (3) o isolamento perene entre populações de uma genealogia podem originar grupos intraespecíficos monofiléticos (Avise *et al.*, 1987).

Adicionalmente, a variação genética intraespecífica pode ser entendida como consequência não apenas de sua estrutura populacional atual, mas também de eventos históricos da população, tais como expansão de área de ocorrência, efeito gargalo, eventos de fragmentação, isolamento, colonização e extinção entre outros. As características biológicas dos organismos (e.g. modo de locomoção, o comportamento reprodutivo e o comportamento alimentar) também são fatores importantes que influenciam suas distribuições (Avise, 2000).

Ainda, vale ressaltar que análises a partir de um único marcador ou gene podem não representar a história real de um organismo ou determinar como os diferentes fatores evolutivos podem gerar o mesmo padrão filogenético e filogeográfico (Patton & Da Silva, 1998; Edwards & Beerli, 2000). Tendo em vista que diferentes marcadores podem gerar genealogias diferentes, os estudos filogeográficos passaram a incorporar múltiplos marcadores nucleares, mitocondriais e dados morfológicos e/ou ecológicos a fim de reduzir essas lacunas.

Mais recentemente, análises da teoria da coalescência que refinam os padrões de ancestralidade e descendência (Brito & Edwards, 2009; Kuhner, 2009; Martins & Domingues, 2011) também foram integradas aos estudos filogeográficos. Esse é o princípio da filogeografia multilocus, a qual preconiza a análise de vários marcadores dispersos ao longo do genoma mitocondrial e nuclear com base em abordagens coalescentes complexas (Kuhner, 2009). Essa análise combinada permite discriminar estatisticamente diferentes cenários históricos capazes de gerar estrutura geográfica em atributos genéticos.

A filogeografia também tem importantes implicações para a conservação já que pode identificar unidades evolutivas distintas (espécies em potencial) e, portanto, pode subsidiar medidas de conservação da biodiversidade (Avice, 2000; Batalha-Filho & Miyaki, 2011). Contudo, a identificação de táxons é mais usualmente realizada pela análise de DNA *barcode* a qual permite acessar rapidamente a riqueza de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) de um determinado grupo, conforme descrito adiante.

2.3. DNA *barcode*

Dada a crescente necessidade de utilizar um método alternativo à identificação morfológica das espécies, uma iniciativa internacional baseada em uma abordagem molecular padronizada que visa à identificação de todos eucariotos foi criada, denominada “*The Barcode of Life Project*” (Hebert *et al.*, 2003a). Essa iniciativa consiste basicamente na utilização de um fragmento de cerca de 650 pares de bases da subunidade I do gene citocromo c oxidase (COI), o qual codifica proteínas envolvidas na cadeia respiratória das mitocôndrias. Tal região é delimitada por sequências conservadas (Folmer *et al.*, 1994), o que permite a amplificação em diferentes grupos de animais (Hebert *et al.*, 2004).

Em 2004, devido ao crescente sucesso da técnica foi desenvolvida uma organização internacional, a *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) dedicada ao desenvolvimento do método para identificação de espécies. Como consequência do grande volume de dados gerados, em 2007 foi criada uma plataforma online e gratuita, o *Barcode of Life Data Systems* (BOLD), para rápida compilação e acesso aos dados, os quais servem como feedback positivo para estudos de identificação (Ratnasingham & Hebert, 2007).

A necessidade de elaboração de uma biblioteca de referência de DNA *barcode* e da construção de modelos para conservação das espécies levou ao lançamento do projeto iBOL (*International Barcode of Life*) em 2010 (<http://www.barcodeoflife.org>). De forma paralela, diferentes projetos foram sendo elaborados para compilação dos dados de grupos específicos, como o *Fish Barcode of Life Initiative* (FISH-BOL) lançado em 2005 (Ward *et al.*, 2009).

O método tem como premissa que todas as espécies apresentam um padrão único de acúmulo de mutações que gera um padrão análogo aos códigos de barras dos produtos. O critério de discriminação das espécies baseia-se no *barcode gap* em que a variação entre as espécies é bem mais elevada que a variação intraespecífica, devendo ser pelo menos 10 vezes maior (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2004). Para a ictiofauna, valores de divergências genéticas iguais ou superiores a 2% tem sido utilizados como indicativo de diferenças entre espécies de peixes marinhos e dulcícolas (Ward *et al.*, 2009). Somado a isso, vários sistemas de algoritmos que utilizam os dados do DNA barcode foram desenvolvidos, os quais utilizados em associação fornecem resultados congruentes e eficazes na delimitação de espécies, dentre eles: BINs, Análise de Clusters, ABGD, GMYC e bPTP.

O sistema de BINs (*Barcode Index Numbers*) e a Análise de Clusters são ferramentas disponíveis na plataforma BOLD que usam o algoritmo RESL (*Refined Individual Linkage*) para agrupar sequências de COI e delimitar Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) sem informações taxonômicas *a priori*. A delimitação das OTUs por esses sistemas são acuradas para avaliar a biodiversidade e auxiliar na discussão e revisão de dados taxonômicos e de distribuição das espécies (Ratnasingham & Hebert, 2013).

O método ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) utiliza o “intervalo do código de barras” (*barcode gap*) como primeira diferença significativa para particionar os dados em prováveis espécies candidatas. Assim, a divergência entre organismos de uma mesma espécie sempre será menor que a de organismos de espécies diferentes. Os prováveis limites e intervalos são recursivamente aplicados aos grupos obtidos de forma que a inferência é refinada até que não haja mais partição dos dados (Puillandre *et al.*, 2012).

O GMYC (*General Mixed Yule-Coalescent analysis*) usa as inferências combinadas da filogenia, especiação e teoria da coalescência para delimitar espécies e requer uma árvore ultramétrica calibrada no tempo como arquivo de entrada. O número de espécies é inferido com base em ramos de árvores gênicas inter e intraespecíficas, de forma que ramificações mais antigas são consideradas como eventos de especiação e ramificações mais recentes como variações intraespecíficas (Pons *et al.*, 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013).

A análise bPTP (*Bayesian Poisson Tree Process*) discrimina espécies com base em uma árvore de verossimilhança enraizada e com tamanho de ramo, onde os agrupamentos recebem suporte de inferência Bayesiana. Os eventos cladogênicos são estimados pelo número de substituições que, por sua vez, refletem os tamanhos dos ramos. Para tal, assume-se que cada substituição possui probabilidade mínima de especiação e é independente de outras substituições. O método utiliza o algoritmo *Evolutionary Placement Algorithm* (EPA) que usa

sequências de referência para rearranjar e calcular a probabilidade de similaridade e inferir o parentesco (Zhang *et al.*, 2013). Recentemente, o método foi aprimorado por Kapli *et al.* (2017) que incorporaram a heterogeneidade nos níveis de diversidade genética intraespecífica às particularidades da história evolutiva e da amostragem de cada espécie, o chamado *Multi-rate Poisson Tree Process* (mPTP).

Embora Hebert *et al.* (2003a) tenham demonstrado a eficiência do DNA *barcode* desenvolvido para identificação de animais, estudos subsequentes têm revelado limitações para a utilidade universal dessa região. Em geral, os casos de falhas são atribuídos à não discriminação de espécies estreitamente relacionadas e de divergência recente (Hebert *et al.*, 2003b), à presença de pseudogenes mitocondriais nucleares (NUMTs - cópias não funcionais de DNA mitocondrial no núcleo) (Song *et al.*, 2008) e ao aumento de táxons não identificados apropriadamente nos bancos de dados, denominados “táxons obscuros” (Page, 2016). Diante desses fatores, a necessidade de uma transição para o *barcode multilocus*, em que o código de barras corresponda com maior fidelidade a árvores de espécies e não de genes, tem sido cogitada (Mallo & Posada, 2016). Adicionalmente, os pesquisadores reconhecem a crescente necessidade de integração das diferentes plataformas bioinformáticas a fim de fornecer informações mais ricas e rápidas que permitam uma compreensão mais profunda da dinâmica e evolução da biodiversidade em um mundo em mudanças cada vez mais aceleradas (Salle *et al.*, 2016).

Não obstante, a metodologia de DNA *barcode* tem se mostrado bastante informativa para descrever a riqueza de espécies da ictiofauna Neotropical. Um estudo amplo realizado por Pereira *et al.* (2013) testou a eficiência do método para identificar a diversidade de peixes da bacia do Alto Paraná. O método mostrou ser eficaz, discriminando corretamente 252 das 254 espécies analisadas. Curiosamente, foi encontrada uma baixa divergência genética interespecífica que pode refletir a diversificação recente para a maioria das espécies dessa região. Por outro lado, algumas espécies com alta divergência intraespecífica (> 2%) apontam para uma diversidade críptica desconhecida com 23 candidatos a novas espécies.

Um aproveitamento total do método foi obtido por Pereira *et al.* (2011) com 58 espécies identificadas para a bacia do Rio Paraíba do Sul e por Carvalho *et al.* (2011) com mais de 100 espécies (cerca de 50%) da ictiofauna da bacia do rio São Francisco. Do mesmo modo, 37 espécies foram claramente identificadas para a bacia do rio Mucuri por DNA *barcode* (Gomes *et al.*, 2015), incluindo indicações de espécies crípticas.

Outra abordagem promissora é o uso combinado das técnicas de sequenciamento de nova geração e do DNA *barcode* para identificação de larvas ao nível de espécie. Maggia *et al.*,

(2017) obtiveram sucesso ao identificar 168 espécies de Siluriformes em afluentes da bacia do rio Amazonas e evidenciaram uma forte variação temporal da atividade reprodutiva de espécies de bagres. Isso amplia as possibilidades da aplicação do COI para o levantamento da ictiofauna e de informações sobre ecologia e reprodução dos peixes com implicações para gestão e conservação das espécies.

2.4. Aspectos filogeográficos em peixes de bacias hidrográficas brasileiras

A história evolutiva dos peixes dulcícolas apresenta um estreito relacionamento com a história das bacias dado ao seu confinamento aos sistemas hidrográficos, e, portanto, eles constituem importantes modelos de estudos biogeográficos e filogeográficos (Lundberg *et al.*, 1998). Contudo, as análises filogeográficas em peixes de água doce na região Neotropical ainda são escassas quando comparadas aos estudos na América do Norte e Europa, embora, a ictiofauna Neotropical, em grande parte representada no território brasileiro, seja a mais diversificada mundialmente (Reis *et al.*, 2003; Buckup *et al.*, 2007).

Ainda que subrepresentados, estudos dessa natureza foram intensificados a partir de 2000 para espécies das Américas do Sul e Central, com destaque para a região amazônica. Por exemplo, um estudo realizado com peixe-agulha *Potamorhaphis guianensis* nas bacias do Orinoco, Amazonas e Guianas demonstrou estruturação genética entre as populações (Lovejoy & Araújo, 2000). De acordo com os autores, as limitações ao fluxo gênico ocorreram por um longo período de tempo e sugerem uma conexão relativamente recente entre as bacias.

Um cenário distinto foi observado em populações monofiléticas de peixes da família Prochilodontidae (curimatãs) das bacias dos rios Paraná, Amazonas, Orinoco e Magdalena. Para esses grupos não houve associação entre estruturação populacional e a geografia, apontando para um alto fluxo gênico dentro das bacias (Sivasundar *et al.*, 2001). Posteriormente, o papel da vicariância, demografia e seleção na modelagem da diversificação do grupo foram sugeridos para explicar o endemismo encontrado (Turner *et al.*, 2004). Tais eventos associados a flutuações do nível dos rios durante o Pleistoceno também foram associados à promoção da diversidade em *Symphysodon* spp. (acará-disco) nas bacias do Amazonas e Solimões (Farias & Hrbek, 2008).

O papel das incursões e regressões marinhas também foram evidenciados por Beheregaray *et al.* (2002) que realizaram um estudo pioneiro em reconstruções filogeográficas na América do Sul, o qual demonstrou uma das mais rápidas taxas de especiação em vertebrados. Os padrões da divergência genética e morfológica encontrados em *Odontesthes perugiae* (peixe-

rei) eram congruentes com as variações no nível do mar do Pleistoceno e do Holoceno. Linhagens altamente divergentes estavam restritas a lagos pleistocênicos que permaneceram isolados, enquanto linhagens com divergências mais recentes eram compatíveis com a última transgressão marinha, por volta de cinco mil anos. Uma origem de diversificação estuarina-marinha foi sugerida devido ao compartilhamento de haplótipos ancestrais com *Odontesthes argentinensis*, espécie tipicamente estuarina (Beheregaray *et al.*, 2002).

Uma ação combinada das alterações do nível do mar, história geológica e a hidrografia criam oportunidades para eventos de cladogênese como evidenciado por inferências filogeográficas no trabalho de Hubert *et al.* (2007a, b). Os resultados identificaram cinco eventos vicariantes, alta dispersão e especiação simpátrica para o gênero *Serrasalmus* (piranhas). Os dados são consistentes com a hipótese do museu, dado que as linhagens dos escudos pré-cambrianos (Guianas e Brasileiro) são mais antigas que as de planícies. A hipótese hidrológica também é reforçada, tendo em vista que as prováveis rotas de dispersão se deram nas margens dos escudos por eventos de captura de cabeceiras que, então, favoreceram a especiação alopátrica.

Estudos dessa natureza têm revelado importantes *insights* sobre o padrão de dispersão e diversificação de peixes de bacias costeiras. Por exemplo, Santos *et al.* (2009) realizaram um dos primeiros estudos que identificou a direção de dispersão a partir de drenagens costeiras para bacias continentais em *Hoplias malabaricus*. Os principais processos que influenciaram o padrão de diversificação do grupo foram a variação do nível do mar e a captura de drenagens entre bacias costeiras e continentais (Pereira *et al.*, 2013). De fato, evidências de paleodrenagens tem permitido sugerir que conexões passadas devido a recuo do mar e o isolamento devido às transgressões marinhas desempenharam um papel significativo na diversificação da ictiofauna de drenagens costeiras brasileiras (e.g., Pereira *et al.*, 2013; Thomaz *et al.*, 2015; Baggio *et al.*, 2017). Embora as publicações com abordagens filogeográficas para as bacias costeiras do Atlântico venham aumentando paulatinamente, o cenário ainda é pouco representativo frente à significância biogeográfica e o alto nível de endemismo da ictiofauna regional (Ribeiro, 2006).

Adicionalmente, outra importante contribuição das abordagens é a evidência cada vez maior de diversidade críptica, isto é, unidades taxonômicas indistinguíveis morfológicamente, mas geneticamente diferenciadas (e.g. Piggott *et al.*, 2011; Borba *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2015; Medrado *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016). Isso é especialmente verdadeiro para espécies com ampla distribuição geográfica como os lambaris do gênero *Astyanax*, os quais se distribuem do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. No caso de *A. bimaculatus*,

descrito originalmente para a bacia amazônica (Suriname e Guianas), populações estruturadas têm sido identificadas em diversas drenagens brasileiras, indicando dispersão a partir das populações originais (Kavalco *et al.*, 2011).

De fato, a especiação de peixes de pequeno porte como os lambaris e cascudinhos tem sido relacionada a processos de vicariância e alopatria. Esses animais apresentam padrões particulares que poderiam explicar as altas taxas de endemismo como: presença de caracteres pedomórficos, ciclos de vida curtos e estratégias reprodutivas adequadas à rápida ocupação, ocupação de diferentes microambientes, além de restrições e limitações quanto a sua capacidade dispersiva (Castro, 1999). Entre os grupos taxonômicos que se enquadram nessa categoria, estão vários representantes da família Loricariidae, umas das mais especiosas entre os teleósteos (Nelson, 2006).

2.5. Família Loricariidae como modelo para estudos filogeográficos

Os Siluriformes representam um grupo rico e excepcionalmente diverso de peixes, com ampla distribuição geográfica (Nelson, 2006). Os peixes dessa ordem assumem desde pequeno até grande porte e, em geral, apresentam hábitos sedentários que contribuem para a dificuldade desses peixes em superar barreiras físicas como cachoeiras e corredeiras que se interpõem às raras migrações (Britski, 1981).

Dentro dessa ordem, os peixes da família Loricariidae, comumente conhecidos como cascudos, possuem uma grande capacidade adaptativa, pois estão presentes em habitats muito variados ao longo de todo o Neotrópico (Reis *et al.*, 2003). Os loricarídeos apresentam adaptações, com destaque para a boca ventral em forma de ventosa, que justificam o sucesso na ocupação de habitats de corredeiras, permitindo que eles possam se aderir e raspar os substratos enquanto respiram (Geerinckx *et al.*, 2007). Desse modo, o grupo é considerado como um modelo promissor para o estudo de padrões biogeográficos e de especiação em água doce Neotropical (Montoya-Burgos, 2003). Por exemplo, o estudo biogeográfico do gênero *Hypostomus* permitiu correlacionar diferentes eventos vicariantes com a diversificação do grupo, tais como: a separação entre as bacias do Paraíba do Sul do Paraná superior, separação da bacia do Amazonas do Paraná-Paraguai, o isolamento do lago Maracaibo do Sistema Paleo-Orinoco-Amazonas e as influências das variações do nível do mar para as bacias costeiras da América do Sul (Montoya-Burgos, 2003).

Ainda nesse grupo de peixes, um estudo recente investigou o padrão filogeográfico em *H. ancistroides*, o qual ocorre no sistema Alto Rio Paraná e nas bacias costeiras do Ribeira de Iguape. Os autores concluíram que as oscilações climáticas permitiram ciclos alternados entre

isolamento prolongado e contato secundário que, por sua vez, favoreceram a ocorrência de espécies crípticas. Simultaneamente, foi inferida que a captura de cabeceiras de drenagens do Tietê por recuos erosivos na encosta da Serra do Mar durante o Pleistoceno levou ao isolamento de populações em Ribeira de Iguape (Carvalho *et al.*, 2015). Por outro lado, em *H. strigaticeps* na bacia do alto rio Paraná não foi evidenciada diversidade críptica (Borba, *et al.*, 2013).

Um estudo biogeográfico e filogenético realizado em representantes da subfamília Hypoptopomatinae, a qual atualmente inclui as tribos Otothyriini, Neoplecostomini e Hypoptopomatini (Lujan *et al.*, 2015), indicou uma origem e posterior dispersão das espécies a partir das drenagens costeiras do Oceano Atlântico (Figura 4) (Roxo *et al.*, 2014). De acordo com os autores, os principais fatores para a diversificação do grupo são a variação do nível do mar ao longo do Cenozóico e as capturas fluviais. Ainda, os clados restritos às drenagens costeiras do Atlântico apresentaram uma menor diversidade genética em relação aos de diversificação mais recente, o que foi relacionado à ocupação de áreas com baixas taxas de captura de cabeceiras. Vale ressaltar que os representantes da tribo Otothyriini, elevadas à categoria de subfamília (Otothyrinae), apresentaram-se monofiléticos dentro de cada bacia analisada, sugerindo restrições ao fluxo gênico.

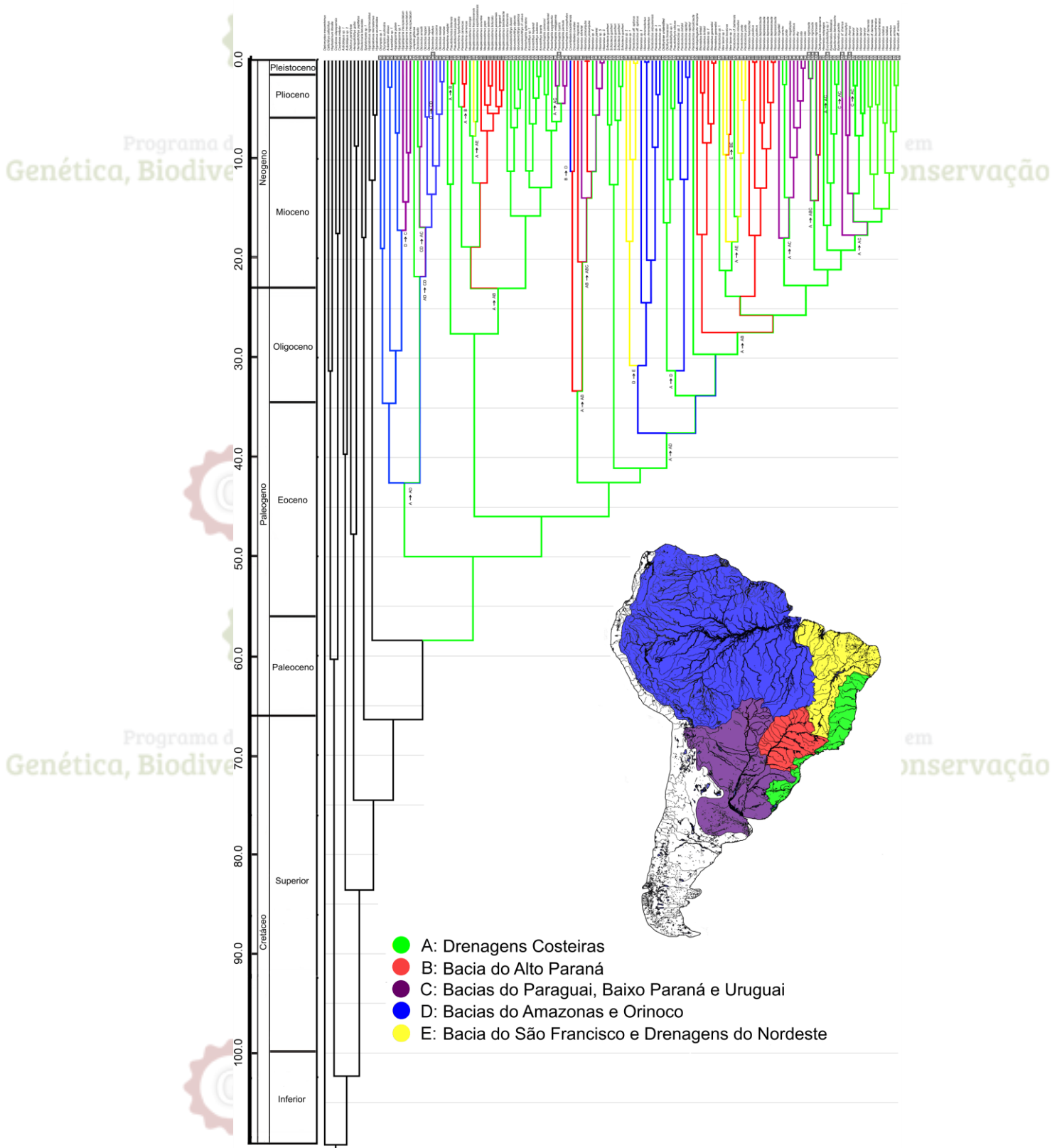


Figura 4. Filogenia de Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Otothyriinae calibrada a partir da origem dos Siluriformes (120 Ma) e Callichthyidae (55 Ma) mostrando a topologia da árvore analisada no BEAST a partir de 155 espécimes de 113 espécies Loricariidae. Adaptado. Fonte: Roxo *et al.* (2014).

O recente trabalho de Roxo *et al.* (2017) realizou importantes estimativas para os pequenos cascudos da subfamília Hypoptopomatinae (Loricariidae), incluindo a origem no Paleoceno (cerca de 58,4 milhões de anos atrás), tamanho estimado do corpo ancestral em cerca de 6 cm e a influência significativa de corredeiras de fluxo rápido e substratos rochosos para a diversificação do grupo (Figura 5). Este último aspecto teve maior influência sobre a tribo Neoplecostomini, resultando em altas taxas recentes de especiação e de diversificação morfológica. Hypoptopomatini e Otothyriini permaneceram ao longo do tempo com pequenos tamanhos corporais e taxas de especiação constantes ou decrescentes, com maior plasticidade na ocupação de habitats em Otothyriini.

De modo geral, os membros dessa subfamília são inteiramente bentônicos e não apresentam livre natação na coluna d'água, com movimentos restritos a curtos deslocamentos entre os locais de fixação no substrato. As espécies ocupam tipicamente habitats de correntezas rápidas a leves com substrato rochosos ou de vegetação (Roxo *et al.*, 2014; Roxo *et al.*, 2017). Os ambientes de corredeiras têm sido associados a menores deslocamentos devido aos riscos inerentes desse tipo habitat (Market *et al.*, 2010). Nesse sentido, a combinação de tamanhos menores, tendência à filopatria e à ocupação de habitats de corredeiras tornam os pequenos cascudos um excelente modelo para estudar os efeitos da evolução da paisagem sobre a diversificação genealógica de linhagens.

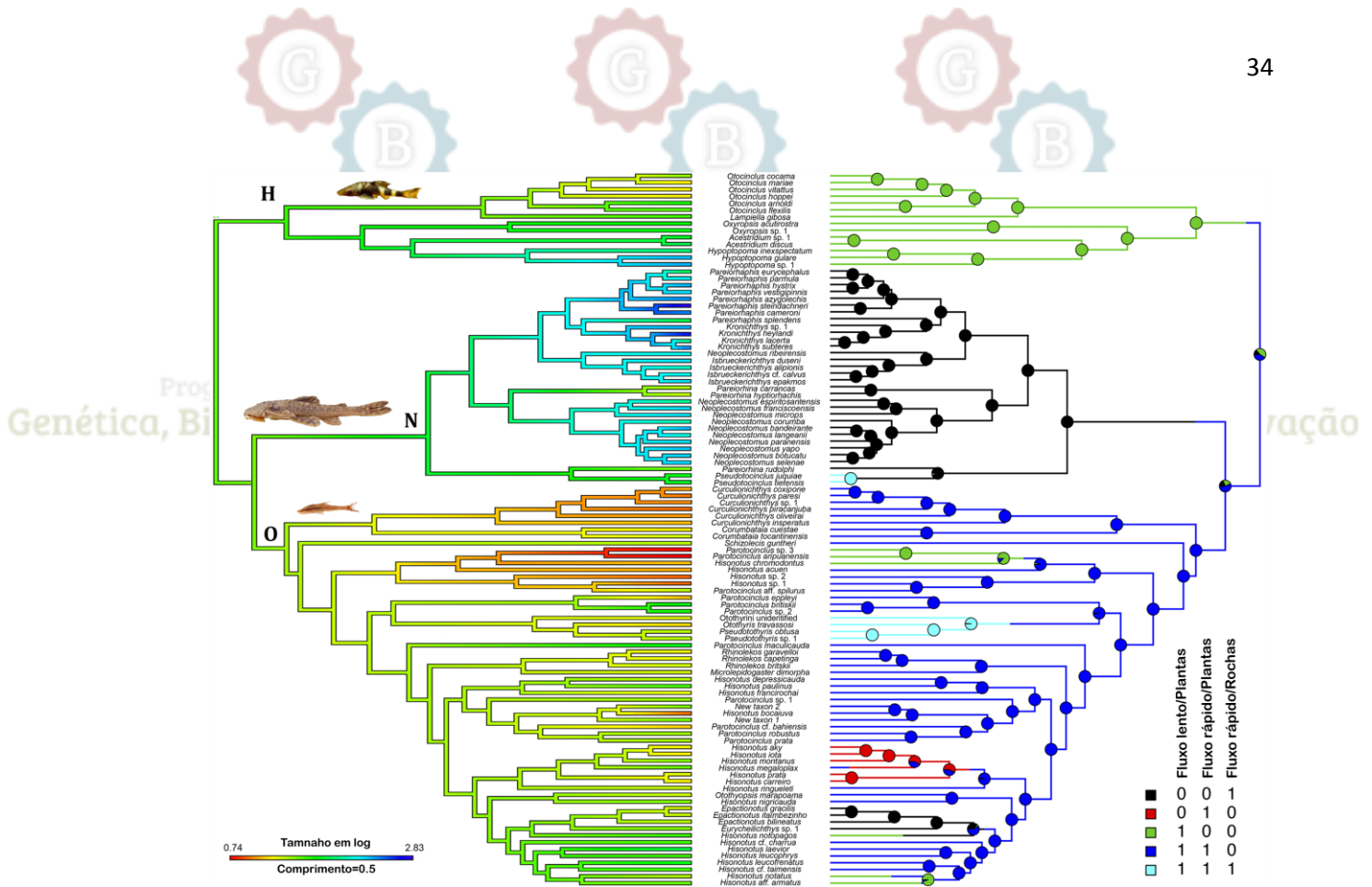


Figura 5. Cladograma à esquerda ilustrando o tamanho máximo estimado do corpo ancestral (MBS), construído com base em uma filogenia calibrada no tempo de Hypoptopomatinae, incluindo as tribos Hypoptopomatini (H), Neoplecostomini (N) e Otothyriini (O). As cores do ramo correspondem às estimativas de MBS (vermelho indicando menor e verde indicando maior). À direita, o cladogramilustrando as estimativas do habitat ancestral para a subfamília Hypoptopomatinae. Fonte: Roxo *et al.* (2017).

O gênero *Parotocinclus* (tribo Otothyriini) apresenta 31 espécies nominais descritas até o momento (Eschmeyer, 2017) e, historicamente, seria o grupo irmão de *Schizolecis*, em um clado composto por *Otothyris* e *Pseudotothyris*, além de ocupar uma posição basal dentro da tribo (Schaefer, 1991, 1998). Por sua vez, Otothyriini é atualmente reconhecida como sendo polifilética, incluindo espécies ainda não descritas formalmente ou previamente alocadas em gêneros distintos (Gauger & Buckup, 2005; Lehmann, 2006). Entre os representantes de *Parotocinclus*, três foram descritos para os rios costeiros da Bahia, *P. cristatus*, *P. jimi* e *P. minutus* (Garavello, 1977, 1988).

Parotocinclus cristatus, conhecido popularmente como cascudinho, chupa-pedra ou limpa-vidro, apresenta pequeno porte e é típico de riachos com leito pedregoso e troncos de árvores submersas, o que implica na existência de matas ciliares preservadas nas áreas de entorno. A espécie foi descrita originalmente para a bacia do rio Almada (Garavello, 1977) e, posteriormente, teve sua área de ocorrência ampliada para as bacias dos rios Cachoeira (limite sul da distribuição), Contas (limite norte de distribuição) e rio Una (limite sul da distribuição)

(Schaefer, 2003; Cetra *et al.*, 2009; Cardoso, 2010; Camelier & Zanata, 2014). O fato de *P. cristatus* apresentar populações conhecidas exclusivas de quatro bacias hidrográficas da Bahia, com provável baixa vagilidade, conforme tipicamente descrito para pequenos cascudos, aliado à complexa história paleohidrológica da região oferece uma excelente oportunidade para traçar padrões filogeográficos da ictiofauna das drenagens costeiras da Bahia.

2.6. Biogeografia histórica das drenagens costeiras do leste do Brasil

Muitos pesquisadores têm utilizado e debatido diferentes hipóteses para explicar a diversificação dos vertebrados na América do Sul. Enquanto a hipótese paleogeográfica (Emsley, 1965) ressalta o papel das mudanças geológicas, Sick (1967) considera a formação do rio Amazonas como um fator preponderante de isolamento para as populações e espécies sul-americanas. Por outro lado, a hipótese de gradiente (Endler, 1982) destaca a importância dos gradientes ambientais na diversidade ao passo que a teoria dos refúgios (Haffer, 1969) correlaciona eventos de endemismo com oscilações climáticas durante o Pleistoceno. Muitas dessas hipóteses têm sido concatenadas e adaptadas para o entendimento da diversificação dos peixes de água doce.

Além dessas, a hipótese hidrogeológica considera que as mudanças nos cursos dos rios e incursões-regressões marinhas modelaram os padrões dos rios e são responsáveis pela diferenciação das espécies aquáticas. As alterações limnológicas devido às incursões marinhas levariam à existência de refúgios nas partes altas dos rios e a posterior regressão promoveria a dispersão das espécies. Sendo assim, são previstos altos níveis de diferenciação genética entre as áreas de refúgio (Montoya-Burgos, 2003; Hubert & Renno, 2006; Hubert *et al.*, 2007; Farias & Hrbek, 2008) seguidas por períodos de expansão nos momentos de regressão do nível do mar.

De fato, a costa leste do Brasil está entre as oito regiões de áreas endêmicas de peixes da América do Sul proposta por Gery (1969), a qual inclui a bacia do rio São Francisco, os riachos costeiros do nordeste acima do rio São Francisco e os riachos costeiros da região sudeste. Os principais fatores determinantes para os padrões biogeográficos encontrados nas bacias do leste do Brasil são: soerguimentos macrodômicos, rifteamento, movimentos verticais entre blocos falhados e o recuo erosivo da margem leste sul-americana (Ribeiro, 2006).

O surgimento dos megadomos a partir da ruptura do Gondwana e separação da América do Sul e África impôs um característico padrão de drenagem, com rios correndo a partir do

centro dessas deformações que configuram a maior parte das principais bacias hidrográficas atuais do escudo cristalino. Atividades tectônicas resultaram em drenagens que desenvolveram longas e sinuosas rotas sobre o escudo cristalino, antes de desaguar no Oceano Atlântico, gerando processos vicariantes que promoveram eventos cladogênicos entre drenagens de terras altas e os tributários do Atlântico (Ribeiro, 2006).

Após a separação completa do Gondwana, iniciou-se a história independente dos rios da margem Atlântica da América do Sul. Segundo Bizerril (1994), a ideia da influência do escudo cristalino sobre as drenagens costeiras seria reforçada pelo compartilhamento de fauna entre as drenagens das bacias do rio Paraná e São Francisco (escudo cristalino) com as drenagens da costa leste do Atlântico. De forma mais precisa, para as drenagens do centro-leste, eventos vicariantes estariam relacionados com a formação do Complexo do Espinhaço (que inclui a Chapada Diamantina), representando um grande divisor de águas interposto entre as drenagens do centro-leste e a do rio São Francisco (Bizerril, 1994).

Porém, a história biogeográfica dos rios do leste do Brasil ainda é mais complexa devido a eventos de captura entre bacias. A captura fluvial é definida como o desvio natural das águas de uma bacia hidrográfica para outra (Christofoletti, 1975). Esse processo pode ocorrer principalmente através da captura por erosão regressiva (Figura 6a), que ocorre quando dois rios adjacentes estão em níveis topográficos diferentes e o tributário do rio inferior erode na direção do rio superior, atravessando-o. Outro mecanismo de captura é o aplanamento lateral (Figura 6b, c) quando um rio corta o divisor de águas lateralmente na direção de outro rio, mas não está necessariamente em níveis diferentes. Além desses, a captura pode ainda ocorrer por transbordamento e a captura subterrânea (Bishop, 1995; Oliveira, 2010). Um dos indícios da captura fluvial é o chamado “cotovelo de captura” que corresponde a uma mudança brusca no curso de um rio (90°) por fatores geológicos. Esses cotovelos podem ser inspecionados por fotointerpretação das drenagens. Contudo, a captura só pode ser validada com a identificação de vales secos ou depósitos associados aos cotovelos (Christofoletti, 1975).

Nesse sentido, entender as mudanças nos cursos dos rios lança luz sobre a história da especiação da ictiofauna. Populações fisicamente separadas por tempo suficiente devido a rearranjos de drenagens podem resultar em diferenciação genética entre essas populações. Assim, sistemas de drenagens adjacentes podem conter espécies de peixes relacionadas, mas geneticamente distintas (Bishop, 1995).

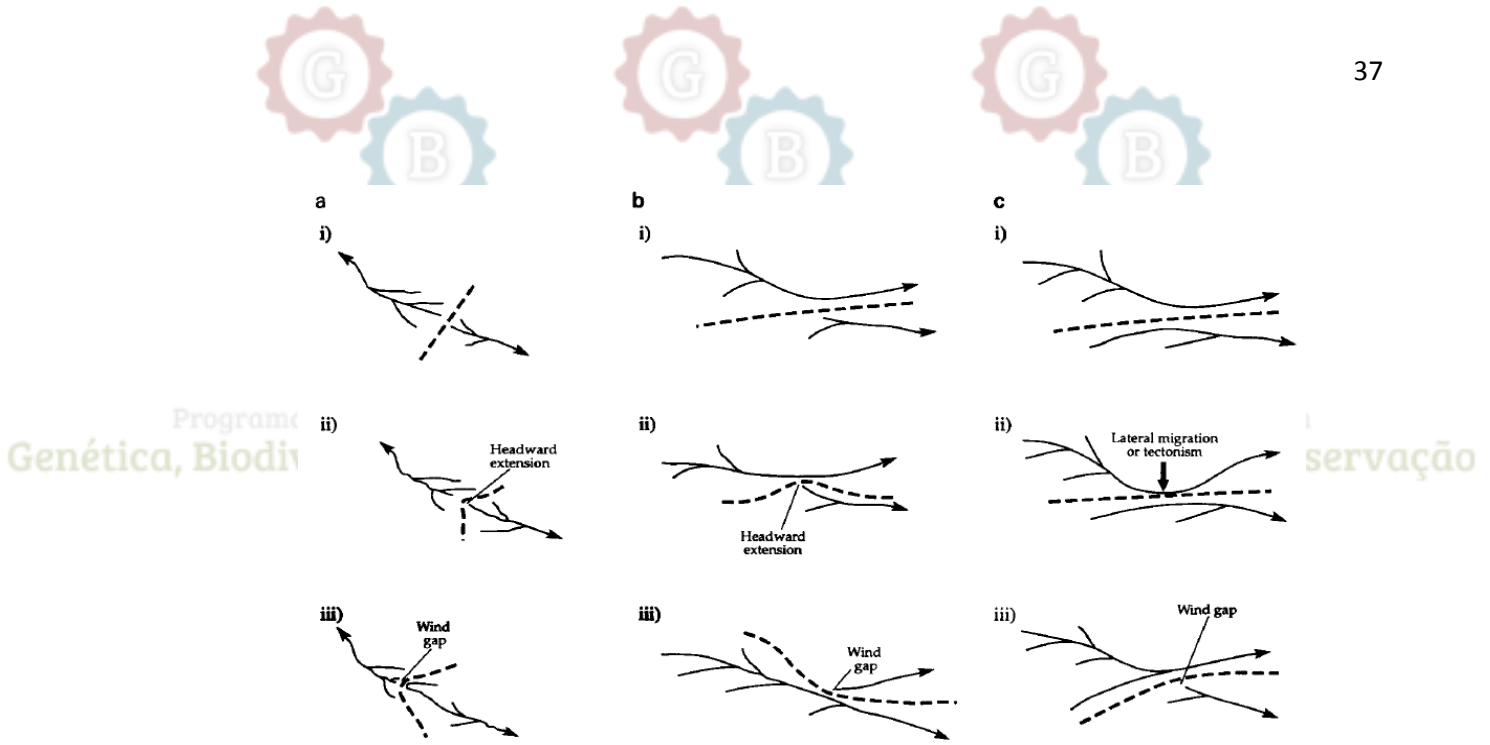


Figura 6. Modelos de rearranjo de drenagem via pirataria de fluxo (captura). A linha tracejada é a divisão de drenagem; (A) ilustra captura por erosão regressiva levando ao recuo de uma das cabeceiras; (B) e (C) ilustram a captura por aplanamento lateral de uma bacia de drenagem adjacente por recuo de uma cabeceira (B) ou captura de drenagem lateral (C) de um tributário adjacente. Fonte: Bishop (1995).

Exemplificando o aspecto supracitado, estudos filogeográficos e de análise de relógio molecular com espécies da tribo Glandulocaudini (Characiformes: Characidae) demonstraram a importância de eventos de captura de cabeceiras para a diversificação do grupo nas drenagens costeiras do leste do Brasil a partir do escudo cristalino. Assinaturas na história demográfica também revelaram a influência de eventos mais recentes como as flutuações do nível do mar nos padrões de distribuição do grupo (Cardoso, 2016). Similarmente, Tagliacollo *et al.* (2015), ao investigarem os efeitos da captação fluvial na história biogeográfica de bagres da família Pimelodidae (Siluriformes), recuperaram três eventos de captura de rios na região de Santa Cruz, no sul da Bolívia, durante o Eoceno tardio até o Mioceno médio. As capturas de drenagens explicariam a ausência de monofiletismo regional associada à presença de muitas espécies que habitam mais de uma bacia.

Contudo, estudos que exploram as características biogeográficas das bacias do leste para explicar padrões filogeográficos são ainda incipientes. Apesar de restritos, alguns trabalhos (Cardoso, 2010; Camelier & Zanata, 2014) indicam a existência de dois grandes grupos ao longo da Ecorregião Mata Atlântica Nordeste (Grupo Norte e Grupo Centro-Sul), com 8 e 16 drenagens, respectivamente (Figura 7). Dentro do Grupo Centro-Sul, há ainda dois subgrupos: Grupo Central e Grupo Sul. O primeiro inclui as drenagens dos rios de Contas, Cachoeira, Almada, Una, Pardo e Jequitinhonha. Dentro desse grupo, dois agrupamentos são distintos, o primeiro é dado pelas bacias dos rios de Contas, Cachoeira, Almada e Una, suportado pela

presença de *Parotocinclus cristatus*. Uma relação ainda mais estreita é inferida entre a drenagem dos rios de Contas, Almada e Cachoeira dado ao compartilhamento de *Leporinus bahiensis*, *Lignobrycon myersi* e *Gymnotus bahianus*. Por fim, Almada e Cachoeira estariam ainda mais estreitamente relacionadas devido ao compartilhamento de *Astyanax vermillion*. O segundo grupo dentro do Grupo Central é formado pelas bacias dos rios Pardo e Jequitinhonha, com um suporte ainda mais robusto e sete espécies compartilhadas. (Camelier & Zanata, 2014).

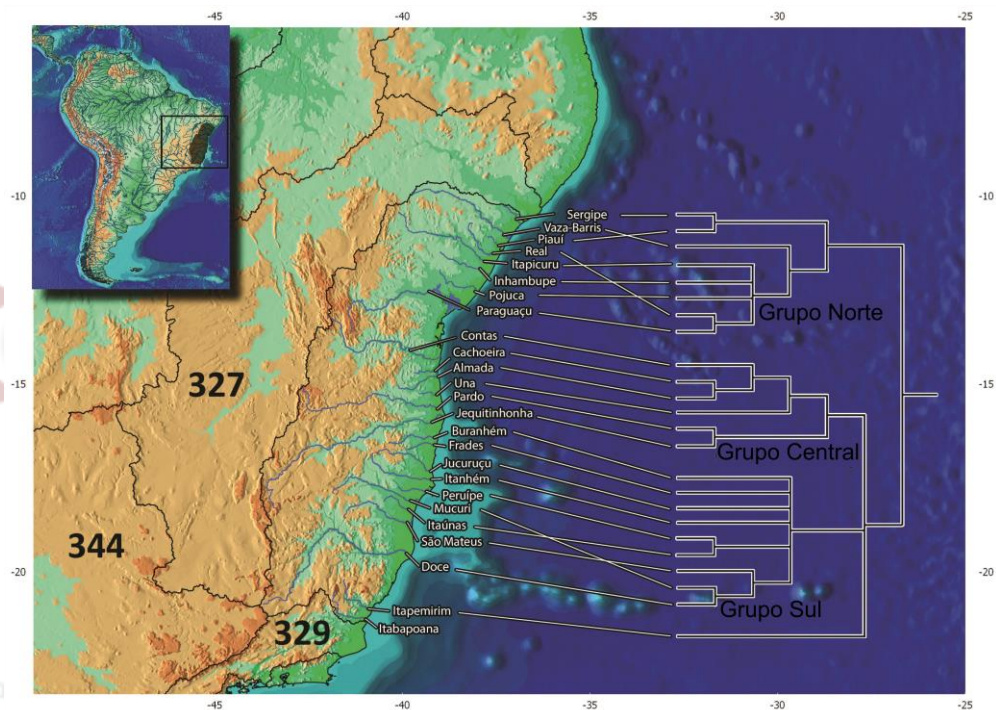


Figura 7. Ecorregião da Mata Atlântica Nordeste e agrupamentos ictiofaunísticos. Os números representam as ecorregiões de água doce adjacentes: (327) São Francisco, (329) Paraíba do Sul e (344) Alto Paraná. Adaptado. Fonte: Camelier e Zanata (2014).

Alguns aspectos biogeográficos ratificam a graduação de espécies compartilhadas com outras bacias e a influência das formações geológicas do Complexo do Espinhaço (escudo cristalino) para a composição ictiofaunística. O Grupo Norte parece ter sua composição mais influenciada pela bacia do rio São Francisco, enquanto que aquelas que compõem o Grupo Sul parecem ter maior relação com outros rios da bacia do Leste.

Por outro lado, as drenagens do Grupo Central, enfocadas nesse trabalho, apresentam uma fauna mais híbrida. Elas também se caracterizam pela presença de grupos basais, indicando que parte da ictiofauna destes rios é formada por táxons remanescentes de uma história biogeográfica antiga (Cardoso, 2010; Camelier & Zanata, 2014). Contudo, não há dados que testem os padrões filogeográficos nas espécies dessa região, restringindo as inferências sobre a história evolutiva das linhagens.

3. OBJETIVO GERAL

Testar a hipótese de estruturação populacional de *Parotocinclus cristatus* ao longo da bacia do rio Almada e entre as bacias dos rios Contas, Cachoeira e Una, relacionando com processos evolutivos históricos, características ambientais e biológicas que possam explicar os padrões espaço-temporais de distribuição.

3.1. Objetivos específicos

- 1) Confirmar por meio do DNA *barcode* a identificação do *P. cristatus* descrito para bacia do Almada bem como sua provável potencialidade para estudos filogeográficos.
- 2) Utilizar o conjunto de dados para determinar se há mais diferenças genéticas entre os espécimes ao longo da bacia do rio Almada do que entre bacias próximas que compartilham a mesma história evolutiva;
- 3) Correlacionar a existência ou ausência de estruturação genética com as hipóteses de isolamento por distância ou capacidade dispersiva pelo modelo de panmixia, associando o papel dos eventos históricos e ambientais na formação de metapopulações ou unidades evolutivas distintas.
- 4) Inferir a história evolutiva das drenagens costeiras do Atlântico Leste e discutir a importância dos eventos biogeográficos na diversificação da ictiofauna regional e suas implicações para a conservação da biodiversidade.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta de material

Foi coletado um total de 110 espécimes identificados no campo como *Parotocinclus cristatus* (Figura 8) na calha principal e tributários do Rio Almada (alto, médio e baixo), além de afluentes das bacias dos rios de Contas, Cachoeira e Una (Figura 9, Tabela 1). As coletas foram realizadas em locais com registro da espécie, cobrindo toda área de distribuição (Garavello, 1977; Schaefer, 2003; Cetra *et al.*, 2009; Camelier & Zanata, 2014). A licença para coleta dos espécimes foi previamente obtida junto ao SISBIO (no. 26752). As coletas foram realizadas com tarrafas ou puçás e, então, os indivíduos foram sacrificados por imersão em gelo (Blessing *et al.*, 2010). Depois de fotografados e etiquetados, foram retiradas amostras de tecido muscular ou nadadeiras de cada exemplar e armazenadas em frascos de 1,5 mL com etanol 100% a -20°C para as análises moleculares. Em seguida, os espécimes foram fixados em formaldeído a 10% por 48h e posteriormente armazenados em álcool 70%.

Os procedimentos de eutanásia e experimentação estão aprovados junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UESB (nº. 32/2013) em projeto cadastrado na instituição intitulado “Análise citogenética da ictiofauna da água doce da Bahia”, o qual, a despeito do título, prevê obtenção de amostras de tecidos para extração e sequenciamento de DNA.

4.2. Identificação morfológica

Exemplares de cada bacia foram depositados nas coleções ictiológicas da UNESP-Botucatu/SP (Dr. Gabriel Costa e Silva). Foram utilizados critérios diagnósticos morfológicos descritos originalmente por (Garavello, 1977).

Os espécimes testemunho identificados pelo Dr. Gabriel Costa e Silva estão depositados nas coleções da UNESP com os respectivos números de tombo: 23667 (*P. cristatus* do rio Catolé, bacia do rio de Contas – amostras 7518 e 7531); 23668 (*P. cristatus* do afluente do rio Salgado, bacia do rio Cachoeira – amostras 7546 e 7541); 23669 (*P. cristatus* do rio Branco, bacia do rio Una – amostras 7493 e 7507); 23670 (*P. cristatus* do afluente do rio Almada, bacia do rio Almada – amostras 7477 e 8363).



Figura 8. Exemplar de *Parotocinclus cristatus* coletado na bacia do Rio Almada. Canto inferior direito mostra o tufo de cristas na placa occipital, um dos caracteres diagnósticos da espécie.



Tabela 1. Caracterização dos pontos de coleta. N (número de amostras); Prof. (profundidade); Veloc. (velocidade).

Bacia	Local de coleta	Município	Coordenadas					Caracterização					
			Sigla	N	Latitude	Longitude	Largura (cm)	Prof. (cm)	Veloc.	Fundo	Margem	Entorno	
Alto Almada	Rio Almada	Almadina	ALT1	17	-14.717071	-39.603042	~600-800	~30-120	Moderada	Areia, rocha	Rocha, gramínea	Gramínea	
Alto Almada	Afluente do Rio Almada	Coaraci	ALT2	19	-14.65667	-39.57128	~100-200	~20-50	Lenta	Areia, rocha	Gramínea	Gramínea, mata	
Médio Almada	Riacho Poço Fundo	Itajuípe	MED	15	-14.717354	-39.481114	~100-300	~20-50	Lenta	Areia, rocha	Gramínea	Mata	
Baixo Almada	Rio Sete Voltas	Ilhéus	BAI1	3	-14.68733	-39.18933	~100-200	~20-40	Lenta	Areia, rocha	Gramínea	Mata	
Baixo Almada	Rio Tiriri	Ilhéus	BAI2	14	-14.723894	-39.171422	~100-300	~30-60	Lenta	Areia, rocha	Gramínea	Mata	
Contas	Rio Catolé	Uruçuca	CON	13	-14.5195	-39.34	~300-500	~40-60	Lenta	Areia	Gramínea	Mata	
Cachoeira	Riacho afluente do Rio Salgado	Floresta Azul	CAC	14	-14.81056	-39.65217	~200-400	~40-60	Lenta	Areia	Gramínea	Mata	
Una/ Aliança	Rio Branco	Arataca	UNA	15	-15.25322	-39.46906	~400-600	~30-120	Lenta	Areia	Gramínea	Mata	

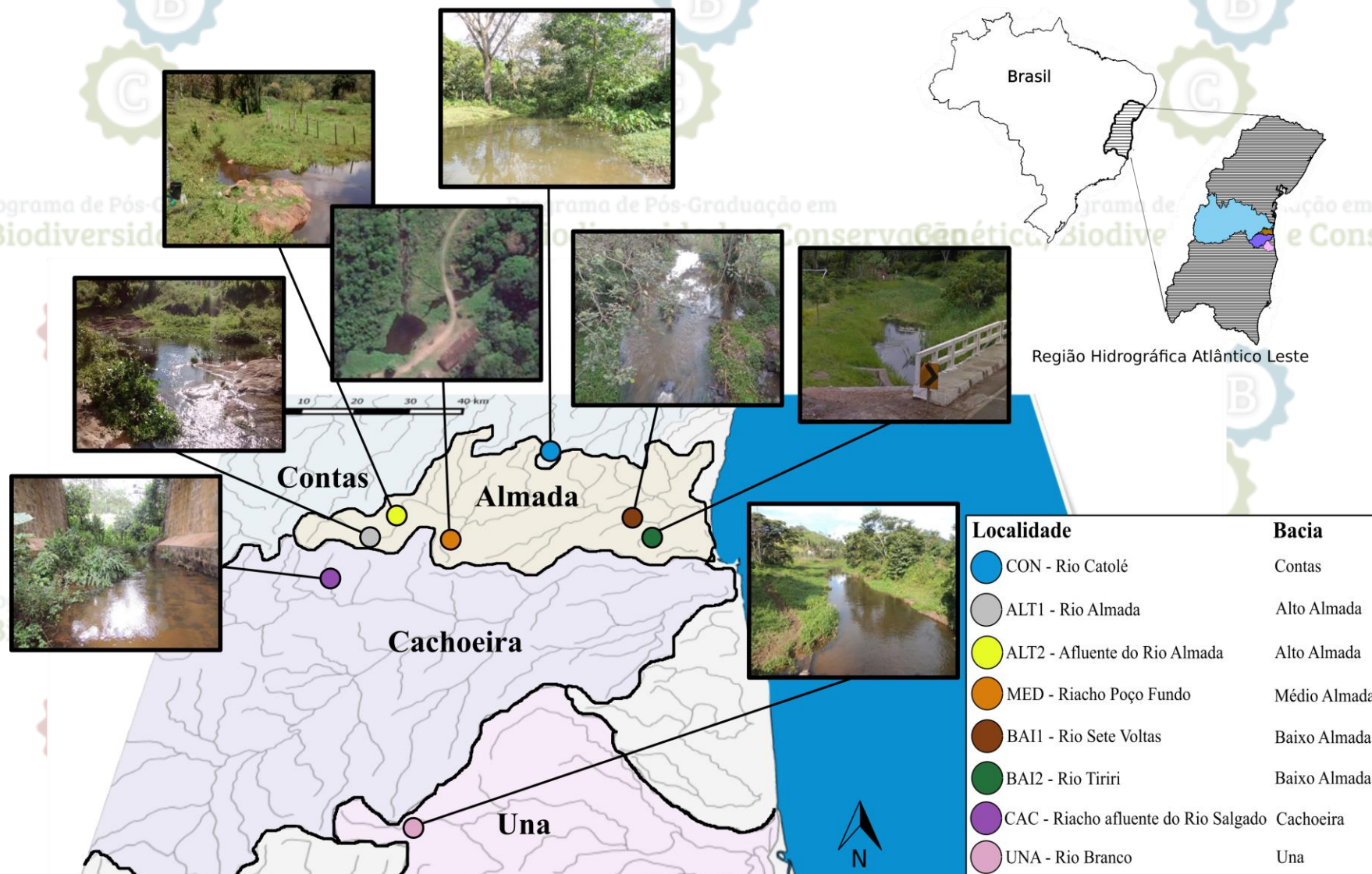


Figura 9. Mapa das bacias hidrográficas (Contas, Almada, Cachoeira e Una) com fotos das localidades amostradas de *Parotocinclus cristatus*.

4.2. Extração de DNA total

Amostras de DNA genômico total foram obtidas utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Estas foram coradas com azul de bromofenol + GelRed na proporção de 3:1 e analisadas em gel de agarose (0,8%) sob as condições de 130 V por 30 minutos para avaliação qualitativa e quantitativa do DNA extraído. A captura foi realizada com o sistema L-PIX (Loccus Biotecnologia) sob luz UV (Figura 10).

As amostras de DNA íntegras e em grande quantidade (inferidas a partir de bandas nítidas após eletroforese) foram utilizadas para amplificação dos marcadores pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

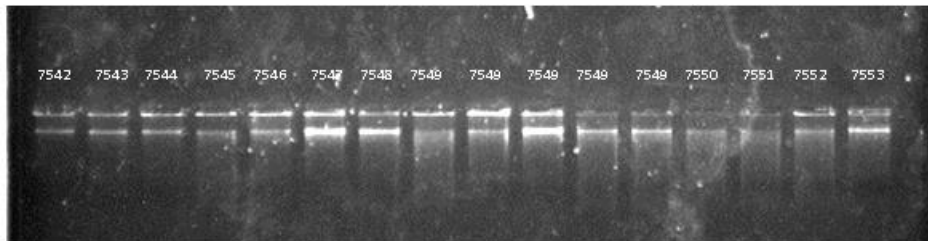


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose para quantificação de DNA genômico.

4.3. Amplificação de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA mitocondrial (COI e Cytb) e nuclear (Rodopsina) foram amplificados por PCR, utilizando os seguintes pares de *primers*:

1) COI: **VF1_t1** (5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG GCA C - 3') + **VR1_t1** (5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACA CTT CAG GGT GAC CGA AGA ATC AGA A - 3') (Ivanova *et al.*, 2007).

2) Citocromo b: **GluDG.L** (5'-TGA CCT GAA RAA CCA YCG TTG - 3') + **H16460** (5' -CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC G - 3') (Perdices *et al.*, 2002).

4) Rodopsina: **Rod-F2w** (5' - AGC AAC TTC CGC TTC GGT GAG AA - 3') + **Rod-R4n** (5' - GGA ACT GCT TGT TCA TGC AGA TGT AGA T - 3') (Sevilla *et al.*, 2007).

Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 15 μ L contendo os seguintes reagentes: tampão de Taq polimerase (1x), $MgCl_2$ (2 mM), *primers* (2 ng/ μ L), DNA genômico (50 ng/ μ L), dNTPs (0,2 mM), Taq DNA polimerase (0,04 U/uL) e água ultrapura q.s.p. A princípio, a desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 4 minutos, prosseguindo com 35 ciclos de 95°C por 40 segundos (desnaturação), 54°C por 40 segundos (hibridação) e 72°C

por 1 minutos e 30 segundos (alongamento), seguindo para mais uma etapa de alongamento final na mesma temperatura por 10 minutos.

Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose (1,2%) usando 3 μ L do produto da PCR corados com azul de bromofenol + GelRed na proporção de 1:1 sob as condições de 120 V por 1 hora para avaliação qualitativa e quantitativa. A captura foi realizada com o sistema L-PIX (Loccus Biotecnologia) sob luz UV (Figura 11).

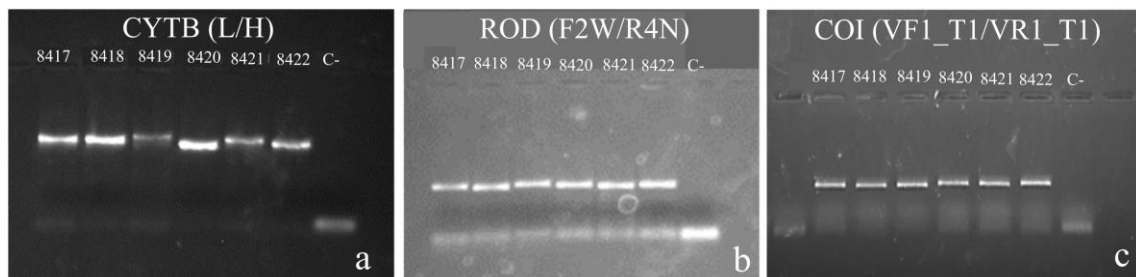


Figura 11. Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) da amplificação de fragmentos de Cytb (a), Rodopsina (b) e COI (c) em amostras de *Parotocinclus cristatus*.

4.4. Sequenciamento de DNA

A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com o método de dideoxinucleotídeos terminais (Sanger *et al.*, 1977) com o kit *Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA), seguindo as instruções do fabricante. A reação teve volume final de 10 μ L, contendo 2 μ L de tampão 5x, 0,5 μ L de Big Dye, 1 μ L de primer (10 μ M), 5,5 μ L de água ultrapura e 1 μ L do produto de DNA amplificado. As amostras foram então sequenciadas bidirecionalmente e a leitura foi realizada em sequenciador automático ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystems).

4.5. Análise das sequências: edição e alinhamento

As sequências foram submetidas ao BLAST (*Basic Alignment Tool Search*) no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmação do fragmento amplificado e comparadas com acessos do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para análise de homologias. Após confirmação dos fragmentos, a qualidade dos eletroferogramas das sequências *forward* e *reverse* obtidas do fragmento de Cytb, Rodopsina e COI foram avaliadas e editadas usando *BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.1.9* (Hall, 1999) no qual também foram obtidas as sequências consenso. No caso de eventuais heterozigotos para o gene nuclear Rodopsina, os picos duplos foram

editados manualmente de acordo com o código IUPAC. Foi realizado um alinhamento utilizando-se a ferramenta *Clustal W* no programa supracitado e, então, as sequências foram traduzidas no programa MEGA v. 6 (Tamura *et al.*, 2011) a fim de verificar possíveis códons de parada. As sequências de COI foram depositadas na plataforma do BOLD (*Barcode of Life Database*). O número de sequências utilizadas para cada marcador está discriminado na Tabela 2.

As etapas finais de alinhamento e edição foram realizadas juntamente com sequências de outras espécies de *Parotocinclus* e de gêneros relacionados para subfamília Otothyriini disponíveis nas plataformas BOLD e *GenBank*. Representantes de outras subfamílias de Loricariidae foram usados como grupo externo (Tabela 3).

Tabela 2. Número de sequências utilizadas para cada marcador por ponto de coleta. N (número de sequências utilizadas).

Localidade	Bacia	Sigla	COI	Cytb	Rodopsina	COI+Cytb
			N	N	N	N
Rio Almada	Alto Almada	ALT1	17	14	13	14
Afluente do rio Almada	Alto Almada	ALT2	19	13	15	13
Riacho Poço Fundo	Médio Almada	MED	14	14	15	14
Rio Sete Voltas	Baixo Amada	BAI1	3	-	-	-
Rio Tiriri	Baixo Almada	BAI2	13	7	14	7
Rio Catolé	Contas	CON	13	12	12	9
Afluente do Rio Salgado	Cachoeira	CAC	14	7	14	7
Rio Branco	Una	UNA	15	8	15	8
Total			108	75	98	72

Tabela 3. Lista de sequências de espécies de *Parotocinclus*, gêneros relacionados da subfamília Otothyriini e espécies de Loricariidae selecionadas como gupo externo obtidas no banco de dados BOLD e *GenBank*.

	COI	Cytb	Rodopsina
	ANGBF8367-12 - <i>Parotocinclus britskii</i>	KM104539.1- <i>Parotocinclus</i> cf. <i>bahiensis</i>	-
	ANGBF8424-12 - <i>Parotocinclus spilosoma</i>	KM104558.1- <i>Parotocinclus aripuanensis</i>	-
	ANGBF8425-12 - <i>Parotocinclus bidentatus</i>	KM104552.1- <i>Parotocinclus maculicauda</i>	-
	GBGCA6851-15 - <i>Parotocinclus</i> aff. <i>spilurus</i>	KM104537.1- <i>Parotocinclus prata</i>	-
	GBGC6516-09 - <i>Parotocinclus maculicauda</i>	KM104538.1- <i>Parotocinclus robustus</i>	-
	GBGC6517-09 - <i>Parotocinclus jumbo</i>	KM104558.1- <i>Parotocinclus aripuanensis</i>	-
	GBGC6519-09 - <i>Parotocinclus</i> cf. <i>aripuanensis</i>	KM104554.1- <i>Parotocinclus eppleyi</i>	-
	GBGCA6837-15 - <i>Parotocinclus prata</i>	KM104542.1- <i>Parotocinclus</i> sp.	-
	GBGCA6838-15 - <i>Parotocinclus robustus</i>	KM104560.1- <i>Parotocinclus</i> sp.	-
	GBGCA6850-15 - <i>Parotocinclus</i> sp.	KM104559.1- <i>Parotocinclus</i> sp.	-
	GBGCA6857-15 - <i>Parotocinclus</i> sp.	KM104561.1- <i>Schizolecis guntheri</i>	-
	MNCE227-17 - <i>Parotocinclus</i> sp.	KM104551.1- <i>Rhinolekos britskii</i>	-
	GBGCA6858-15 - <i>Parotocinclus</i> sp.	KM104531.1- <i>Otothyropsis marapoama</i>	-
	BSB089-10 - <i>Parotocinclus</i> sp.	KM104553.1- <i>Otothyris travassosi</i>	-
	GBGCA6856-15 - <i>Parotocinclus aripuanensis</i>	KM104562.1- <i>Hisonotus insperatus</i>	-
	GBGCA8674-15 - <i>Parotocinclus eppleyi</i>	KM104548.1- <i>Hisonotus depressicauda</i>	-
	MNCE213-17 - <i>Parotocinclus cearensis</i>	KM104540.1- <i>Hisonotus bocaiuva</i>	-
	MNCE218-17 - <i>Parotocinclus seridoensis</i>	KM104528.1- <i>Epactionotus bilineatus</i>	-
	MUCU055-13 - <i>Parotocinclus doceanus</i>	FJ965509.1- <i>Corumbataia cuetae</i>	-
	GBGCA6839-15 - <i>Parotocinclus</i> cf. <i>bahiensis</i>	-	-
	ANGBF2478-12 - <i>Hisonotus depressicauda</i>	-	-
	ANGBF2486-12 - <i>Hisonotus insperatus</i>	-	-
	GBGCA6840-15 - <i>Hisonotus bocaiuva</i>	-	-
	FPSR114-09 - <i>Schizolecis guntheri</i>	-	-
	FUPR495-09 - <i>Corumbataia cuetae</i>	-	-
	FUPR625-09 - <i>Rhinolekos britskii</i>	-	-
	GBGC6476-09 - <i>Pseudotothyris obtusa</i>	-	-
	GBGC6484-09 - <i>Epactionotus bilineatus</i>	-	-
	BSB075-10 - <i>Microlepidogaster</i> sp.	-	-
	GBGCA6849-15 - <i>Otothyris travassosi</i>	-	-
Externo	FUPR571-09 - <i>Hypostomus nigromaculatus</i>	FJ965533.1- <i>Hypostomus nigromaculatus</i>	JN230989.1- <i>Hypostomus</i> sp.
	FUPR1345-10 - <i>Farlowella amazonum</i>	KP960069.1- <i>Farlowella vittata</i>	KY945415.1- <i>Ancistrus</i> sp.

4.6. Análise de DNA *Barcode*

O alinhamento final com fragmentos do gene COI foi inserido no programa MEGA v. 6 (Tamura *et al.*, 2011) para obtenção das matrizes de distância genética par a par e da matriz de distância dentro e entre as espécies com base no modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980). A árvore de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) com base no modelo K2P e 1000 réplicas de *bootstrap* foi obtida no mesmo programa supracitado.

A fim de verificar os agrupamentos e o seu grau de confiabilidade, foi realizada a inferência de Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana (BI) em programas implementados na plataforma online CIPRes (*Cyber Infrastructure for Phylogenetic Research*) Science Gateway (phylo.org) (Miller *et al.*, 2010), desenvolvida para processar grandes conjuntos de dados e otimizar o tempo computacional. A análise de ML foi processada no programa RAxML v.8.0 (Stamatakis, 2014) utilizando o modelo de substituição GTRCAT onde os parâmetros foram estimados pelo programa. A inferência BI foi processada no programa Mr. Bayes v3.2.63 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) usando o modelo evolutivo GTR+I+G conforme determinado pelo programa jModelTest (Posada, 1998) pelo critério de seleção BIC (*Critério Bayesiano de Schwarz*). Para essa análise, foram realizadas duas corridas com quatro cadeias independentes de 10 milhões de gerações cada, sendo amostradas a cada mil gerações. Foram descartadas 10% (*burn-in*) das árvores amostradas, e então, calculada a probabilidade posterior (PP) na árvore consenso.

Na plataforma BOLD foi realizada a análise de *Cluster Sequences*, a qual atribui OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) às sequências depositadas independentemente do registro do BIN usando o algoritmo RESL (*Refined Individual Linkage*). Foram aplicados os seguintes parâmetros: modelo de distância par a par, alinhamento pelo BOLD Alinhador (*Amino Acid HMM*) e o método de exclusão em pares e filtro para apenas sequências ≥ 100 pb no caso de *gap* ou ambiguidades.

Para a análise de *barcode* por ABGD foi submetido um arquivo (mega) contendo as sequências consenso alinhadas na plataforma <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>. Para o algoritmo GMYC, foi gerada inicialmente uma árvore ultramétrica no programa BEAST. 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012) com os seguintes parâmetros: duas corridas independentes com 10 milhões de gerações cada, com amostragem a cada 1.000 gerações; modelo HKY+I+G; relógio molecular estrito com taxa de mutação arbitrária (1,0 substituição/sítio/Ma) e método de coalescência de Yule *a priori*. O desempenho e a convergência da corrida MCMC (Monte Carlo via Cadeias de Markov) foram visualizadas no

Tracer 1.5 (Rambaut *et al.*, 2013) a fim de conferir se os parâmetros de ESS (*Effective Sample Size*) estavam acima de 200. Foram descartadas 10% (*burn-in*) das árvores amostradas e uma árvore consenso foi montada usando o TreeAnnotator v1.6.2 (Rambaut & Drummond, 2015). Por fim, a árvore foi utilizada como arquivo de entrada para a análise online (<http://species.h-its.org/gmyc/>) pelo método de limiar único (Zhang, *et al.*, 2013).

Para a análise de bPTP uma árvore enraizada de ML obtida no servidor CIPRes foi utilizada como *input* no servidor (<http://species.h-its.org/ptp/>) a fim de receber suporte BI. Para a árvore de ML, foi utilizado o haplótipo mais representativo de cada localidade. Os parâmetros para a análise bPTP foram: corrida com 100.000 gerações de MCMC, *Thinning* = 100, e 10% de *burn-in*. O diagnóstico da corrida foi visualizado na opção “*Likelihood Trace Plot*”.

4.7. Análises filogenéticas e estimativa de tempo de divergência

Além do COI, foi realizada uma reconstrução filogenética por ML e BI para os genes Cytb e Rodopsina pelos programas RAxML-HPC (Stamatakis, 2014) e Mr. Bayes v3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), respectivamente, implementados no portal CIPRes (Miller *et al.*, 2010). No caso da árvore de ML, foi utilizado o modelo de substituição GTRCAT, onde os sítios invariáveis e a distribuição gama são estimados para cada gene. O suporte da análise foi estimado a partir de 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Para a inferência BI, o melhor modelo para cada gene foi calculado pelo jModelTest (Posada, 1998), sendo GTR+G para Cytb e GTR+I+G para Rodopsina. A corrida da BI consistiu de 10 milhões de gerações para duas corridas independentes com quatro cadeias de MCMC cada e 10% de *burn-in*.

A reconstrução de uma árvore calibrada no programa BEAST. 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012) foi realizada apenas para os genes mitocondriais concatenados (COI+Cytb). A hipótese de relógio molecular não foi rejeitada pelo teste implementado no MEGA v. 6 (Tamura *et al.*, 2011) ($p < 0,05$). Assim, a corrida assumiu um relógio estrito com uma taxa de mutação de 1% por milhão de anos, conforme comumente utilizada para DNA mitocondrial em peixes (Strecker *et al.*, 2004; Ornelas-García *et al.*, 2008; Thomaz, *et al.*, 2015) sob um *prior* com distribuição normal. A corrida foi realizada com 10 milhões de gerações de MCMC, com parâmetros amostrados a cada 1000 gerações. Foi utilizado o modelo GTR+G estimado pelo jModelTest (Posada, 1998). A qualidade e a convergência da corrida foram examinadas no Tracer 1.5 (Rambaut *et al.*, 2013) a fim de averiguar se os valores ESS estavam acima de 200. Por fim, foi gerada a árvore consenso no TreeAnnotator v1.6.2 (Rambaut & Drummond, 2015) e realizado um *burn-in* de 10%.

4.8. Análises populacionais e filogeográficas

4.8.1. Estimativas de estrutura genética

As relações entre haplótipos foram verificadas por redes haplotípicas construídas com o método de agrupamento dos vetores medianos (Bandelt *et al.*, 1999) no programa PopART (<http://popart.otago.ac.nz>) para cada um dos marcadores utilizados (COI, Cytb e Rodopsina).

Os valores de F_{ST} par a par para verificar a diferenciação genética entre os pares de populações e a partição da variação genética dentro e entre as populações pela análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foram estimados no programa ARLEQUIN 3.11 (Schneider *et al.*, 2000) para os marcadores mitocondriais (COI e Cytb). A significância do teste foi verificada pelo método de permutação aleatória com 1.000 permutações. A análise do valor de F_{ST} foi realizada de acordo com os critérios propostos por Wright (1978) (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação dos valores de divergência (F_{ST}) proposta por Wright (1978).

F_{ST}	Divergência
0,00 - 0,05	Baixa
0,05 - 0,15	Moderada
0,15 - 0,25	Alta
>0,25	Muito alta

Adicionalmente, o nível de estruturação genética espacial com base nos marcadores mitocondriais foi avaliado pela análise espacial da variância molecular (SAMOVA) no programa SAMOVA 2.0 (Dupanloup *et al.*, 2002). O método delimita grupos genéticos entre localidades geograficamente homogêneas e maximamente diferenciadas entre elas. A análise foi executada variando o número de grupos (k) de 2 a 7 com 1000 simulações para cada K. Os valores gerados de índices de fixação (F_{CT} – estruturação entre grupos e F_{ST} – estruturação entre localidades entre grupos) foram comparados e o agrupamento que indicou maior estruturação foi escolhido como o k mais provável.

Ainda, a estruturação populacional foi verificada por meio do método Bayesiano pelo programa BAPS 5.3 (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) (Corander *et al.*, 2008). A análise determina o número mais provável de populações (k) assumindo um modelo de mistura, sendo a análise repetida 500 vezes por indivíduo.

Para os marcadores mitocondriais, o teste de Mantel foi realizado para verificar se havia isolamento por distância a partir da correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das amostras. A análise foi realizada com o *input* das matrizes de distâncias genéticas e geográficas no portal IBDWS 3.23 (<http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>) (Jensen *et al.*, 2005).

4.8.2. Parâmetros populacionais e análises de demografia histórica

Para todas as análises subsequentes foram utilizados o COI e Cytb. Foram calculadas as diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (por sítio) (π) utilizando o *DNA Sequence Polymorphism* - DnaSP v. 5.10 (Librado & Rozas, 2009).

A história demográfica das populações foi inferida por testes de neutralidade seletiva de Tajima (D) (Tajima, 1989), F_s de Fu (Fu, 1997) e R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), realizadas no programa DnaSP v. 5.10 (Librado & Rozas, 2009). A significância destes testes foi determinada com base em 10000 simulações coalescentes.

Para estimar as mudanças no tamanho efetivo das populações ao longo do tempo pelo método BI foi utilizado o *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) (Heled & Drummond, 2008) com o auxílio do programa BEAST 1.8 (Drummond & Rambaut, 2007). Para cada filogruppo, foram realizadas duas corridas independentes de EBSP com 10 milhões de gerações de MCMC, com parâmetros amostrados a cada 1000 gerações e *burn-in* de 10%. Foi utilizado um relógio estrito com uma taxa de mutação de 1% sob um *prior* com distribuição normal e modelo GTR+G estimado pelo jModelTest (Posada, 1998) com o critério de informação de Akaike (AIC). A qualidade e a convergência da corrida foram examinadas no Tracer 1.5 (Rambaut *et al.*, 2013) assim como a construção do gráfico de coalescência.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação morfológica

Os critérios diagnósticos morfológicos utilizados para a identificação das amostras de *Parotocinclus cristatus* foram os descritos por Garavello (1977). Esses incluem: 22-23 placas na linha lateral 22-23; occipital com um tufo de dentículos (Figura 8); abdômen totalmente coberto por grandes placas entre o coracóide e nadadeira ventral; 3-5 placas alongadas em cada lado e duas ou três séries irregulares centralizadas; 26-30 dentes premaxilares e 24-28 dentários.

Portanto, os espécimes coletados correspondem ao morfotipo *Parotocinclus cristatus* e a amostragem cobriu toda a área da distribuição considerada para a espécie (Garavello, 1977; Schaefer, 2003; Cetra *et al.*, 2009; Camelier & Zanata, 2014) conforme preconizado para inferências filogeográficas (Turchetto-zolet *et al.*, 2013).

5.2. Análise de DNA *barcode*

Foi obtido um fragmento de 589 pb de um total de 108 indivíduos de *Parotocinclus* de diferentes pontos da bacia do rio Almada e em uma localidade das bacias dos rios de Contas, Cachoeira e Una. O alinhamento final apresentou 72 sítios variáveis e a composição de bases foi de 25.7% de timina (T), 31.4% (C), 24.2% de adenina e 18.7% de guanina (G).

A distância genética intraespecífica das sequências de COI por localidade e por bacia variou de 0 a 0,4%. Quando todas as populações amostradas foram agrupadas, a variação intraespecífica foi 4,5% (Tabela 5).

A distância genética entre os exemplares amostrados de cada localidade variou de 0% a 10,1% (Tabela 6). Ao considerar as distâncias genéticas por bacia, observamos valores de 4,8 a 5,2% entre Almada e Contas, de 5,2 a 9,1% entre Almada e Cachoeira e de 9,3 a 9,8% entre Almada e Una. Por sua vez, a distância entre as populações das bacias dos rios de Contas e Cachoeira foi de 9,9% enquanto um valor de 10,1% foi observado ao se comparar amostras da bacia do rio de Contas e Una. A menor distância foi verificada entre *Parotocinclus* das bacias dos rios Cachoeira e Una (0,3%).

Tabela 5. Distâncias genéticas intraespecíficas (D) e erro-padrão (S.E.) utilizando dados do COI baseados no modelo K2P.

Grupos		D	S.E.
Localidade	ALT1	0,004	0,001
	ALT2	0,004	0,002
	MED	0,004	0,001
	BAI1	0,001	0,001
	BAI2	0,001	0,001
	CON	0,000	0,000
	CAC	0,001	0,001
	UNA	0,002	0,001
	Bacias	CONTAS	0,000
ALMADA		0,004	0,001
CACHOEIRA		0,001	0,001
UNA		0,002	0,001
Todos exemplares		0,045	0,006

Tabela 6. Distância genética par-a-par entre amostras de *P. cristatus* por localidade a partir de dados das sequências de COI com base no modelo K2P (diagonal inferior: valores de distância; diagonal superior: desvio padrão).

Localidades	1	2	3	4	5	6	7
1. ALT1		0,002	0,002	0,003	0,003	0,010	0,015
2. ALT2	0,004		0,002	0,003	0,003	0,010	0,015
3. MED	0,004	0,004		0,003	0,003	0,010	0,015
4. BAI1	0,005	0,005	0,005		0,000	0,010	0,015
5. BAI2	0,005	0,005	0,005	0,000		0,010	0,015
6. CON	0,052	0,051	0,052	0,048	0,048		0,015
7. CAC	0,096	0,095	0,096	0,091	0,091	0,099	
8. UNA	0,098	0,097	0,098	0,093	0,093	0,101	0,003

Ao considerar as sequências de COI dos exemplares coletados com outras espécies de *Parotocinclus*, os valores de divergência genética variaram de 9,1% (*P. maculicauda* – *P. cristatus* SET/TIR, bacia do rio Almada) a 24,3% (*P. aripuanensis* – *P. cristatus*, bacia do rio Cachoeira). Quando os dados de COI foram confrontados com os demais gêneros na subfamília, a variação da distância genética foi de 9,9% (*Pseudotothyris obtusa* – *P. cristatus* da bacia do rio de Contas) a 21,5% (*Otothyris travassosi* – *P. cristatus* da bacia do rio Una) (Tabela 7).

Tabela 7. Distância genética interpopulacional e interespecífica nas sequências de COI baseados no modelo K2P. Diagonal inferior: comparações par-a-par entre os espécimes coletados por localidade e outras espécies *Parotocinclus* e gêneros relacionados disponíveis no BOLD. Diagonal superior: desvio padrão.

Localidade/Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
1. ALT1		0.002	0.002	0.003	0.003	0.010	0.015	0.015	0.025	0.018	0.015	0.016	0.014	0.021	0.022	0.018	0.018	0.024	0.020	0.026	0.025	0.023	0.017	0.019	0.016	0.016	0.019	0.027	0.015	0.023	0.017	0.016	0.021	0.017	0.016	0.016	0.017	0.023	0.023	
2. ALT2	0.004		0.002	0.003	0.003	0.010	0.015	0.015	0.025	0.018	0.015	0.016	0.014	0.021	0.022	0.018	0.018	0.024	0.020	0.026	0.025	0.023	0.017	0.019	0.016	0.016	0.019	0.027	0.015	0.023	0.017	0.016	0.021	0.017	0.016	0.016	0.017	0.024	0.023	
3. MED	0.004	0.004		0.003	0.003	0.010	0.015	0.015	0.025	0.018	0.015	0.016	0.014	0.021	0.022	0.018	0.018	0.024	0.020	0.026	0.025	0.023	0.017	0.019	0.017	0.016	0.019	0.027	0.015	0.023	0.017	0.016	0.021	0.017	0.016	0.016	0.017	0.024	0.023	
4. BAI1	0.005	0.005	0.005		0.000	0.010	0.015	0.015	0.026	0.018	0.015	0.016	0.015	0.021	0.023	0.018	0.017	0.025	0.021	0.026	0.026	0.023	0.017	0.019	0.016	0.016	0.019	0.027	0.015	0.023	0.016	0.017	0.021	0.017	0.016	0.017	0.017	0.024	0.024	
5. BAI2	0.005	0.005	0.005	0.000		0.010	0.015	0.015	0.026	0.018	0.015	0.016	0.015	0.021	0.023	0.018	0.017	0.025	0.021	0.026	0.026	0.023	0.017	0.019	0.016	0.016	0.019	0.027	0.015	0.023	0.016	0.017	0.021	0.017	0.016	0.017	0.017	0.024	0.024	
6. CON	0.052	0.051	0.052	0.048	0.048		0.015	0.015	0.024	0.018	0.017	0.016	0.016	0.023	0.023	0.017	0.017	0.025	0.021	0.027	0.026	0.023	0.017	0.021	0.016	0.018	0.019	0.027	0.016	0.023	0.015	0.015	0.020	0.019	0.015	0.016	0.018	0.024	0.023	
7. CAC	0.096	0.095	0.096	0.091	0.091	0.099		0.002	0.025	0.018	0.019	0.016	0.018	0.022	0.022	0.018	0.017	0.026	0.021	0.027	0.027	0.023	0.017	0.021	0.016	0.019	0.020	0.026	0.018	0.022	0.017	0.017	0.020	0.017	0.019	0.018	0.017	0.024	0.021	
8. UNA	0.098	0.097	0.098	0.093	0.093	0.101	0.003		0.024	0.018	0.019	0.016	0.018	0.022	0.022	0.018	0.017	0.025	0.021	0.026	0.026	0.022	0.017	0.021	0.016	0.020	0.020	0.027	0.018	0.022	0.017	0.017	0.020	0.017	0.019	0.019	0.017	0.024	0.021	
9. <i>P. britskii</i>	0.216	0.216	0.217	0.217	0.217	0.204	0.208	0.206		0.024	0.025	0.023	0.025	0.024	0.018	0.025	0.025	0.012	0.024	0.015	0.013	0.021	0.024	0.022	0.024	0.024	0.025	0.027	0.017	0.023	0.024	0.024	0.023	0.024	0.025	0.023	0.025	0.022	0.021	
10. <i>P. spilosoma</i>	0.125	0.125	0.127	0.125	0.125	0.131	0.130	0.131	0.198		0.017	0.016	0.018	0.021	0.019	0.019	0.018	0.024	0.023	0.027	0.027	0.024	0.006	0.020	0.005	0.017	0.019	0.027	0.016	0.019	0.018	0.017	0.019	0.019	0.017	0.017	0.018	0.022	0.024	
11. <i>P. bidentatus</i>	0.095	0.096	0.096	0.096	0.096	0.122	0.134	0.135	0.205	0.116		0.017	0.010	0.023	0.023	0.020	0.018	0.024	0.021	0.026	0.026	0.023	0.017	0.021	0.017	0.015	0.021	0.024	0.014	0.023	0.018	0.016	0.021	0.017	0.015	0.017	0.023	0.025		
12. <i>P. sp1</i>	0.109	0.109	0.109	0.104	0.104	0.104	0.102	0.102	0.204	0.109	0.114		0.017	0.022	0.022	0.012	0.006	0.024	0.021	0.028	0.026	0.024	0.016	0.019	0.016	0.017	0.017	0.026	0.017	0.022	0.010	0.016	0.020	0.016	0.017	0.018	0.015	0.025	0.023	
13. <i>P. maculicauda</i>	0.090	0.090	0.091	0.091	0.091	0.112	0.124	0.125	0.214	0.125	0.049	0.112		0.022	0.023	0.018	0.018	0.025	0.022	0.028	0.026	0.024	0.017	0.020	0.017	0.015	0.019	0.026	0.015	0.023	0.017	0.015	0.021	0.017	0.014	0.016	0.017	0.022	0.026	
14. <i>P. jumbo</i>	0.161	0.162	0.161	0.164	0.164	0.193	0.175	0.175	0.203	0.164	0.190	0.173	0.170		0.023	0.023	0.023	0.028	0.025	0.029	0.028	0.026	0.021	0.023	0.020	0.018	0.022	0.030	0.022	0.021	0.022	0.024	0.022	0.022	0.022	0.021	0.023	0.025	0.026	
15. <i>P. cf. aripuanensis</i>	0.187	0.186	0.187	0.188	0.188	0.191	0.170	0.171	0.136	0.153	0.186	0.185	0.186	0.194		0.023	0.024	0.020	0.025	0.021	0.022	0.022	0.020	0.021	0.020	0.021	0.026	0.021	0.023	0.023	0.021	0.023	0.020	0.022	0.023	0.023	0.023	0.023	0.025	0.023
16. <i>P. prata</i>	0.128	0.127	0.128	0.124	0.124	0.118	0.129	0.130	0.227	0.140	0.148	0.061	0.129	0.187	0.199		0.010	0.023	0.022	0.027	0.024	0.020	0.018	0.021	0.018	0.019	0.016	0.025	0.020	0.023	0.006	0.018	0.020	0.019	0.019	0.020	0.014	0.021	0.024	
17. <i>P. robustus</i>	0.129	0.129	0.130	0.124	0.124	0.124	0.122	0.122	0.227	0.129	0.134	0.017	0.132	0.195	0.207	0.043		0.022	0.020	0.026	0.024	0.022	0.018	0.021	0.018	0.018	0.016	0.024	0.018	0.023	0.012	0.018	0.021	0.018	0.019	0.019	0.014	0.023	0.024	
18. <i>P. sp2</i>	0.215	0.215	0.216	0.215	0.215	0.222	0.219	0.217	0.064	0.212	0.216	0.218	0.222	0.253	0.151	0.201	0.195		0.021	0.012	0.014	0.019	0.024	0.022	0.025	0.025	0.025	0.017	0.025	0.026	0.025	0.024	0.026	0.024	0.027	0.025	0.023	0.020	0.023	
19. <i>P. aff. spilurus</i>	0.165	0.165	0.166	0.168	0.168	0.174	0.177	0.176	0.211	0.189	0.174	0.177	0.184	0.215	0.213	0.172	0.155	0.168		0.020	0.023	0.023	0.023	0.017	0.022	0.022	0.022	0.024	0.022	0.025	0.024	0.021	0.025	0.022	0.023	0.023	0.020	0.023	0.023	
20. <i>P. aripuanensis</i>	0.236	0.236	0.237	0.237	0.237	0.243	0.228	0.226	0.093	0.246	0.237	0.249	0.250	0.262	0.173	0.235	0.225	0.069	0.175		0.013	0.020	0.028	0.024	0.027	0.025	0.025	0.014	0.025	0.027	0.029	0.025	0.030	0.028	0.027	0.026	0.024	0.023	0.025	
21. <i>P. sp3</i>	0.223	0.224	0.224	0.224	0.224	0.224	0.225	0.223	0.076	0.233	0.224	0.224	0.228	0.245	0.176	0.210	0.201	0.087	0.201	0.069		0.020	0.027	0.024	0.027	0.025	0.026	0.012	0.025	0.025	0.026	0.024	0.027	0.027	0.026	0.025	0.024	0.021	0.024	
22. <i>P. eppleyi</i>	0.202	0.201	0.201	0.204	0.204	0.201	0.194	0.192	0.163	0.206	0.200	0.205	0.210	0.231	0.184	0.170	0.182	0.139	0.196	0.152	0.153		0.024	0.023	0.023	0.024	0.023	0.023	0.023	0.026	0.022	0.025	0.023	0.025	0.025	0.024	0.022	0.023	0.025	
23. <i>P. cearensis</i>	0.120	0.120	0.121	0.120	0.120	0.126	0.120	0.120	0.204	0.020	0.121	0.101	0.122	0.173	0.164	0.126	0.121	0.212	0.186	0.259	0.246	0.212		0.020	0.006	0.017	0.019	0.028	0.017	0.019	0.017	0.016	0.018	0.018	0.017	0.017	0.017	0.023	0.024	
24. <i>P. seridoensis</i>	0.145	0.144	0.144	0.144	0.144	0.159	0.175	0.175	0.188	0.153	0.161	0.150	0.164	0.186	0.174	0.172	0.169	0.202	0.123	0.217	0.216	0.198	0.156		0.020	0.020	0.024	0.025	0.020	0.023	0.020	0.020	0.022	0.021	0.021	0.022	0.023	0.023	0.021	
25. <i>P. sp4</i>	0.112	0.112	0.113	0.107	0.107	0.112	0.112	0.113	0.207	0.015	0.113	0.101	0.117	0.161	0.161	0.127	0.121	0.221	0.183	0.243	0.230	0.203	0.022	0.151		0.016	0.018	0.028	0.015	0.019	0.016	0.016	0.018	0.018	0.016	0.017	0.016	0.022	0.024	
26. <i>P. docemus</i>	0.104	0.104	0.105	0.104	0.104	0.125	0.137	0.137	0.212	0.117	0.091	0.112	0.089	0.134	0.174	0.140	0.132	0.226	0.181	0.232	0.219	0.226	0.119	0.167	0.109		0.020	0.026	0.018	0.019	0.017	0.016	0.021	0.018	0.015	0.018	0.020	0.022	0.024	
27. <i>P. bahiensis</i>	0.143	0.143	0.143	0.137	0.137	0.138	0.155	0.156	0.250	0.143	0.165	0.127	0.149	0.175	0.226	0.117	0.107	0.232	0.178	0.238	0.228	0.205	0.140	0.217	0.129	0.140		0.028	0.019	0.023	0.018	0.019	0.024	0.021	0.017	0.019	0.014	0.025	0.029	
28. <i>P. sp5</i>	0.243	0.243	0.243	0.243	0.243	0.237	0.225	0.226	0.114	0.237	0.265	0.227	0.231	0.265	0.165	0.216	0.204	0.110	0.204	0.077	0.060	0.181	0.252	0.213	0.243	0.222	0.241		0.026	0.027	0.027	0.025	0.027	0.030	0.027	0.028	0.026	0.022	0.024	
29. <i>Hisonotus depressicauda</i>	0.106	0.106	0.106	0.106	0.106	0.116	0.134	0.134	0.197	0.103	0.101	0.114	0.104	0.167	0.193	0.148	0.135	0.221	0.189	0.229	0.218	0.200	0.116	0.157	0.100	0.120	0.151	0.224		0.023	0.018	0.014	0.022	0.018	0.014	0.016	0.017	0.025	0.023	
30. <i>Hisonotus insperatus</i>	0.180	0.179	0.179	0.179	0.179	0.176	0.180	0.180	0.201	0.147	0.185	0.170	0.179	0.155	0.188	0.195	0.192	0.22																						

A partir desses dados foi construída a árvore de NJ usando o modelo K2P, conforme preconizado na análise de DNA *barcode*, a qual apresentou altos valores de suporte (99-100%) para os clusters individuais formados por amostras das bacias do rio de Contas e rio Almada e para o grupo constituído por amostras das bacias dos rios Cachoeira e Una (Figura 12). O agrupamento que reúne as populações das bacias do rio Almada e Contas também apresentou um valor de suporte elevado (96%). As inferências usando ML e BI recuperaram a mesma topologia da árvore de NJ de modo que somente os valores de confiabilidade dos ramos obtidos por esses métodos foram inseridos no dendrograma por NJ (Figura 12).

Observa-se que os grupos mais apoiados pela ML foram Contas (100%) e Cachoeira+Una (99%), enquanto a relação entre as populações Contas e Almada obteve 98% de suporte. No caso da análise por BI, valores máximos de probabilidade *a posteriori* foram recuperados o agrupamento formado pelos grupos Contas + Almada, Contas isoladamente e Cachoeira+Una. Tanto o grupo Almada como aquele que reúne os indivíduos das quatro bacias tiveram suporte de 0,9 na BI. Ainda, as amostras das localidades do baixo Almada formaram um grupo fortemente apoiado por esse método (Figura 12). Por outro lado, as relações observadas na topologia da árvore entre as amostras coletadas e as demais espécies de *Parotocinclus* e gêneros de Otothyriini apresentaram um excesso de politomias e baixos valores de suporte.

A análise de *Cluster Sequences* disponível no portal do BOLD discriminou três OTUs (*Operational Taxonomic Units*), representadas por amostras das bacias do rio Almada (1), Contas (2) e Cachoeira+Una (3) (Figura 12, Tabela 8). De forma semelhante, os algoritmos ABGD ($p < 0,05$), GMYC e bPTP separaram os mesmos três grupos (Figura 12, Anexo 1, 2 e 3, respectivamente).

Tabela 8. Resultado da análise de *Cluster* mostrando as Distâncias de *Nearest Neighbor* (NN) para cada OTU estimada.

OTUs	Localidade	N	Distância		
			Média	Máxima	<i>Nearest Neighbor</i> (NN)
1	Almada	66	0,295	0,813	4,065
2	Contas	11	0	0	4,065
3	Cachoeira/Una	28	0,084	0,813	6,910

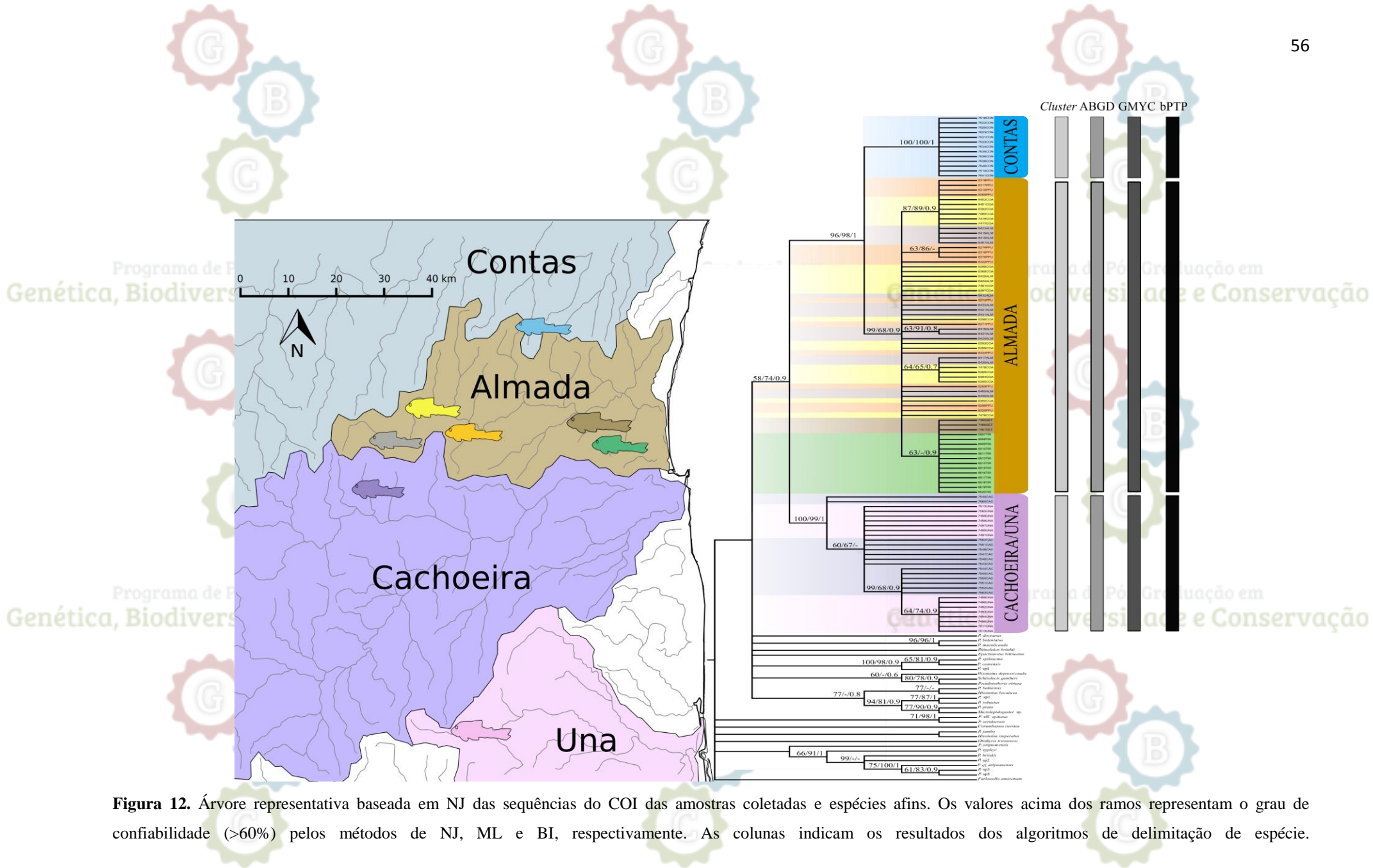


Figura 12. Árvore representativa baseada em NJ das seqüências do COI das amostras coletadas e espécies afins. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade (>60%) pelos métodos de NJ, ML e BI, respectivamente. As colunas indicam os resultados dos algoritmos de delimitação de espécie.

5.3. Análises filogenéticas e estimativa de tempo de divergência

A reconstrução filogenética pelos métodos de ML e BI com base no fragmento mitocondrial Cytb (835 pb) apresentaram a mesma topologia (Figura 13). Ambas as inferências recuperaram com valores máximos de suporte os grupo Contas e Cachoeira+Una. O grupo Almada apresentou um suporte inferior por ML (93%) e um alto suporte por BI (1.0). Dentro do grupo Almada, o agrupamento de amostras do baixo Almada apresentou um alto valor de probabilidade *a posteriori*, assim como um agrupamento reunindo as populações dos trechos alto e médio da bacia do rio Almada. O nó interno que reúne todos os espécimes coletados nesse estudo também foi fortemente apoiado. No caso da BI, alguns nós mais basais que incluem as espécies retiradas dos bancos de dados foram também fortemente sustentados (Figura 13).

Por outro lado, a reconstrução filogenética pelos métodos de ML e BI para o fragmento nuclear Rodopsina além de apresentarem a mesma topologia, também revelaram uma menor estrutura filogenética que os fragmentos mitocondriais (Figura 14). Houve uma clara distinção entre dois grandes grupos, um representado por espécimes das bacias dos rios Almada e Contas (100% ML, 0.9 BI), enquanto o segundo grupo reuniu as amostras das bacias dos rios Cachoeira e Una (100% ML, 0.7 BI).

A emergência dos grupos foi estimada para ter início em torno de 4,2 Ma. (Plioceno Inferior) com a separação de duas principais linhagens, a do grupo Cachoeira+Una da linhagem Contas+Almada (Figura 15). O evento cladogênico subsequente foi estimado para 2,3 Ma. (Plioceno Superior) com a separação de linhagens do grupo Contas do grupo Almada. Por outro lado, a divergência entre as linhagens do baixo e do médio+alto Almada remontam para cerca de 0,8 Ma (Pleistoceno Inferior). As diversificações mais recentes entre os membros de cada grupo começam em torno de 0,4 Ma. (Pleistoceno Superior).

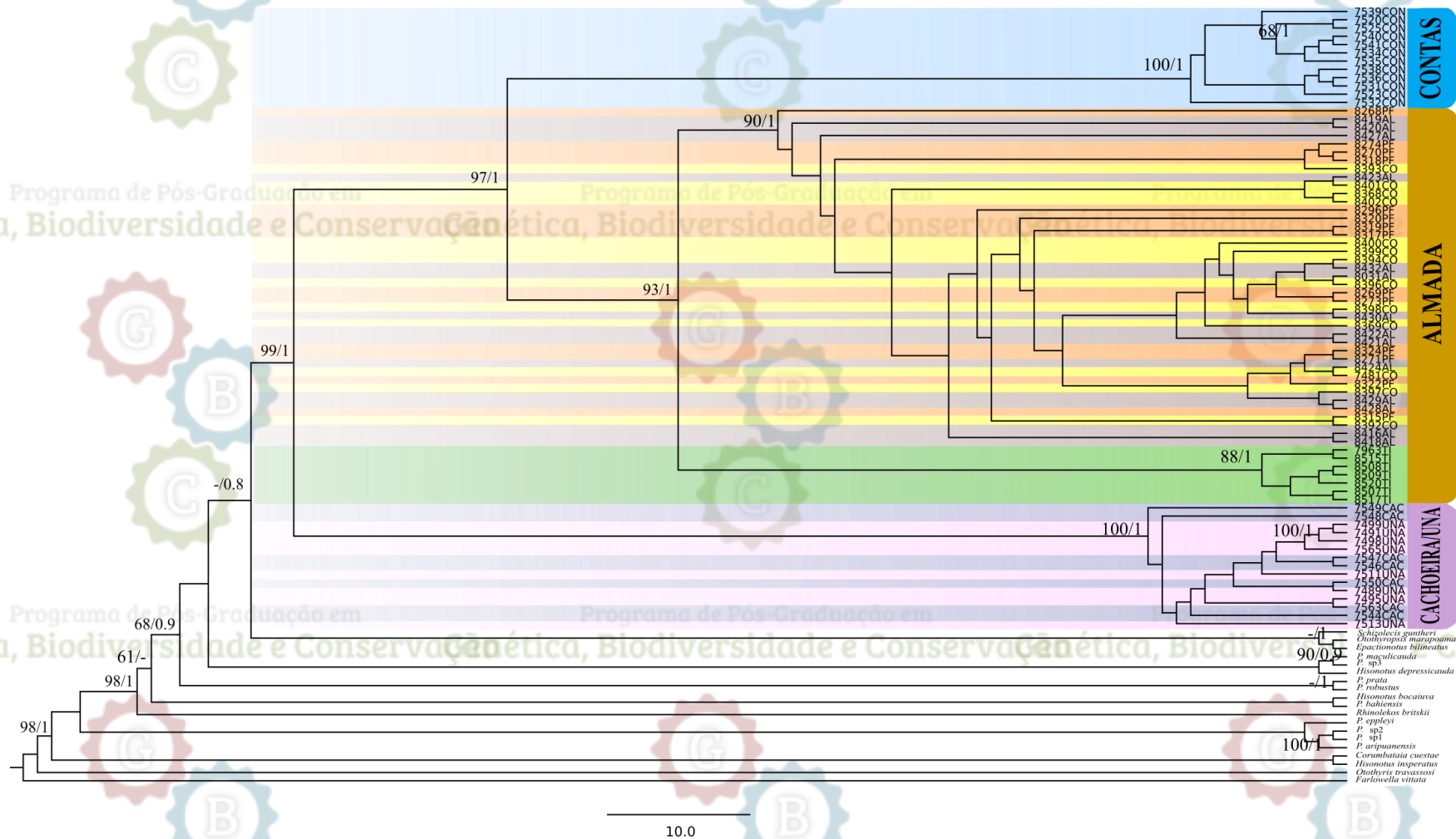


Figura 13. Topologia recuperada pelo método de ML e BI baseados nas sequências mitocondriais do gene Cytb dos espécimes amostrados e espécies afins. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade (>60%) pelos métodos de ML e BI, respectivamente.

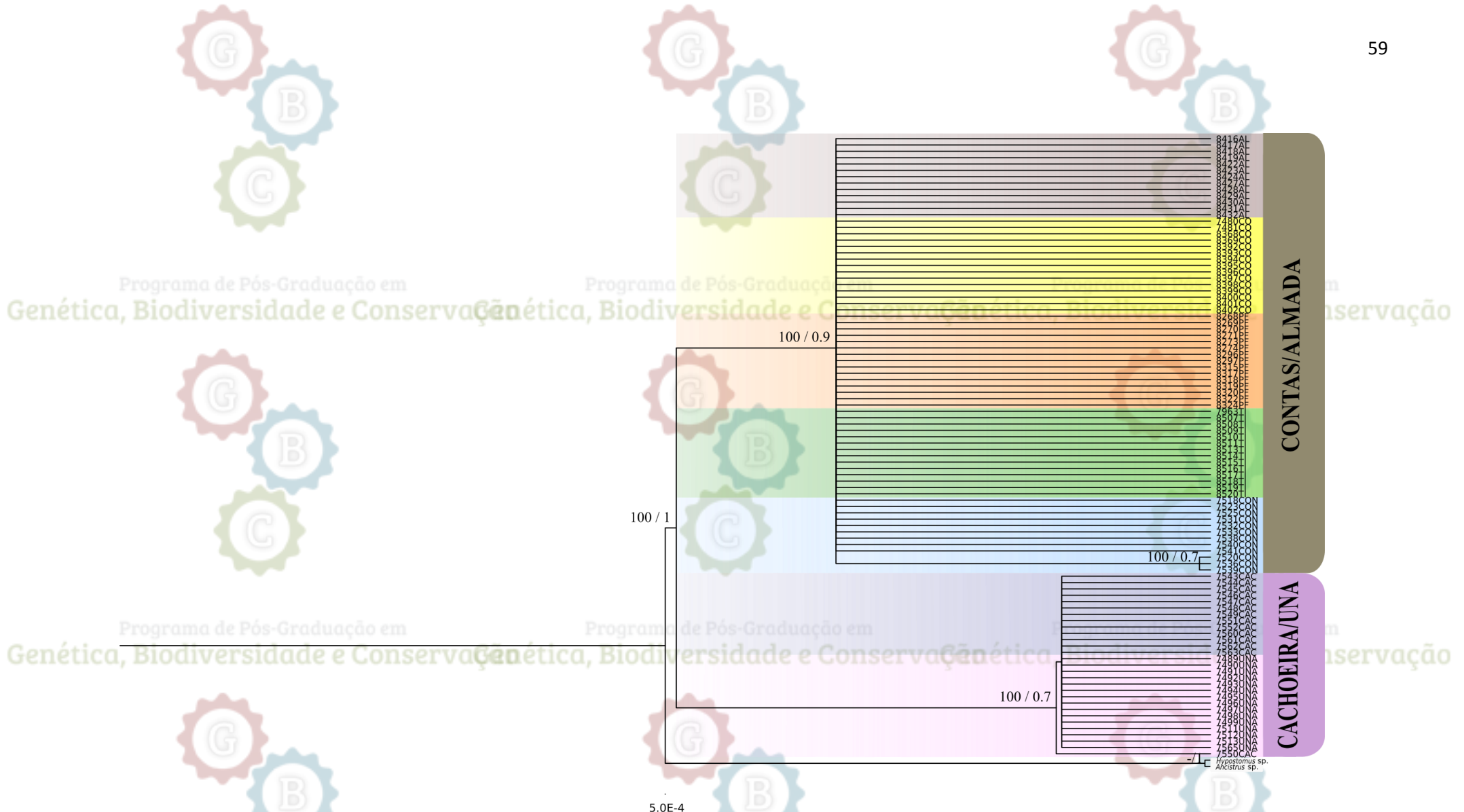


Figura 14. Topologia recuperada pelo método de ML e BI baseados nas sequências mitocondriais do gene Rodopsina dos espécimes amostrados. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade (>60%) pelos métodos de ML e BI, respectivamente.

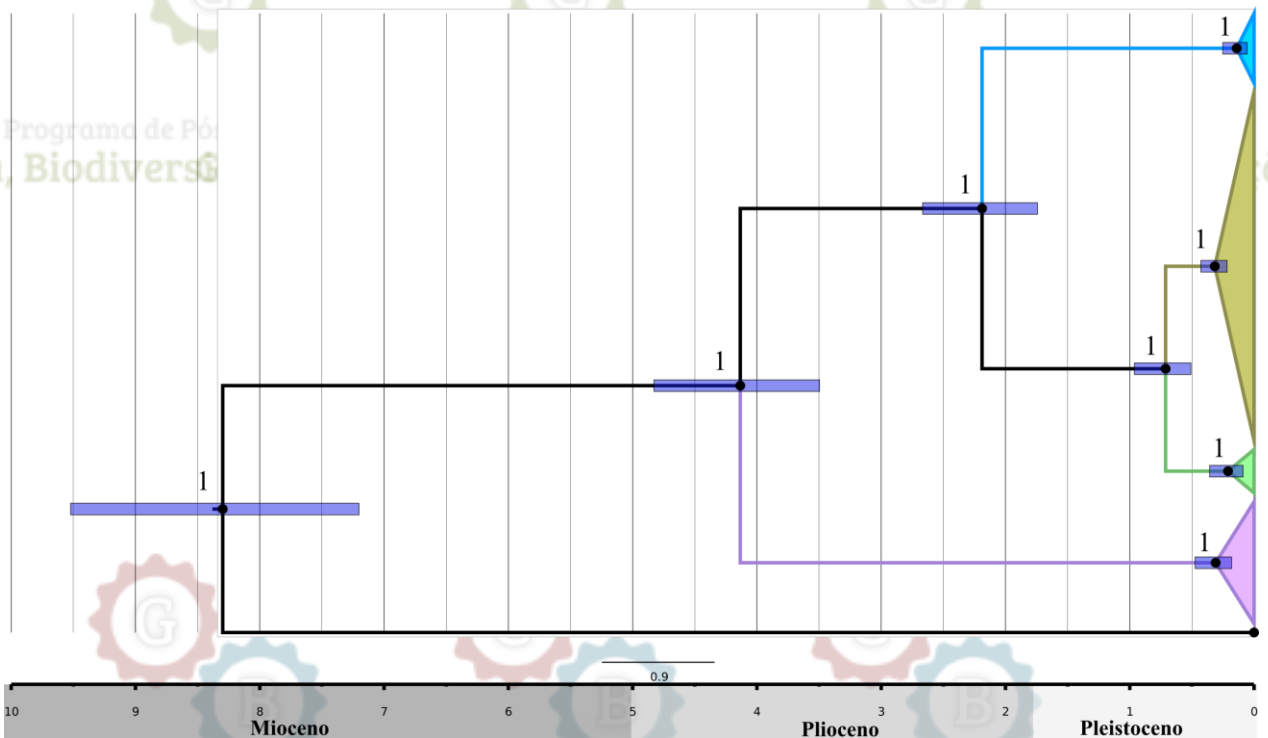


Figura 15. Estimativas do tempo (em milhões de anos) para a divergência de *Parotocinclus cristatus* e diversificação de seus quatro haplogrupos. Os ramos dentro de cada haplogrupos são colapsados. O haplogrupos azul representa os indivíduos coletados na bacia do rio de Contas, o haplogrupos em ocre indica as amostras do alto e médio Almada, enquanto os haplogrupos verde e lilás representam as populações do baixo Almada e das bacias Cachoeira+Una. Os valores de probabilidade posteriores são mostrados acima dos nós. A barra azul indica intervalos de confiança de 95%.

5.4. Análises populacionais e filogeográficas

5.5. Estimativas de estrutura genética

As 108 seqüências de COI (589pb) compreenderam 22 haplótipos, formando quatro haplogrupos (Figura 16A). O haplogrupos Contas apresenta alta diferenciação genética por estar separado dos demais por 23 passos mutacionais. O haplótipo mais comum para esse grupo foi H17 encontrado em 12 amostras. Para os haplótipos amostrados da bacia do rio Almada foi observado uma subestruturação composta por dois haplogrupos, um representando o baixo Almada e outro agrupando alto+médio Almada, separados por um passo mutacional. Destaca-se que o haplogrupos alto+médio Almada apresentou um padrão estrelado de diversificação. O haplótipo mais comum para amostras dessa bacia foi o H6, encontrado em 16 amostras de três localidades (ALT1, ALT2 e MED), seguido do H2 que foi encontrado em 14 amostras nessas mesmas localidades. A maior diferenciação genética foi observada em relação ao haplogrupos Cachoeira+Una, com 45 passos mutacionais separando-

os dos demais grupos. Ainda nesse grupo, foram observados haplótipos exclusivos (CAC e UNA), enquanto o haplótipo H18 foi o mais comum, presente em 13 amostras das duas bacias.

As 75 sequências de Cytb (835 pb cada) recuperaram um total de 29 haplótipos congruentes com a estrutura gerada pelo COI (Figura 16B). Com base nesse gene, o haplogrupo Contas está separado por 36 passos mutacionais dos demais, sendo os haplótipos H21 e H23 os mais frequentes, identificados em 4 amostras cada. O haplogrupo do baixo Almada foi separado do haplogrupo alto+médio Almada por 11 passos mutacionais. Para essa bacia, os H1 e H5 foram os haplótipos mais representativos, encontrados nas três localidades do alto e médio Almada. O haplogrupo Cachoeira+Una apresentou uma alta diferenciação com 57 passos mutacionais em relação aos demais grupos ou bacias.

O padrão filogeográfico gerado pelas 98 sequências de Rodopsina com 473 pb recuperou o mesmo padrão revelado pela reconstrução filogenética de ML e BI (Figura 16C). Foram discriminados dois grandes haplogrupos, separando as amostras das bacias dos rios de Contas e Almada das populações das bacias dos rios Cachoeira e Una por 6 passos mutacionais.

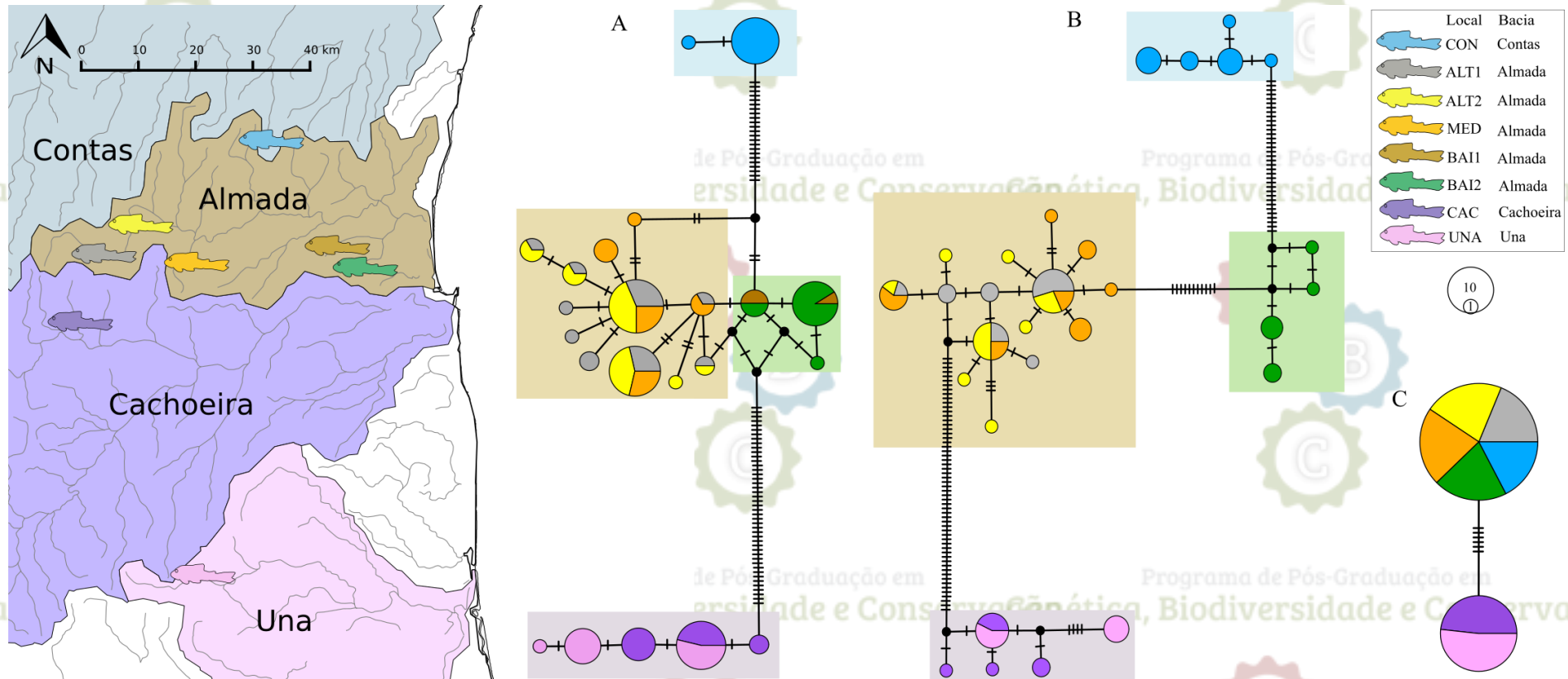


Figura 16. Localidades amostradas de *P. cristatus* e rede de haplótipos para os genes mitocondriais e nucleares. A) Rede de haplótipos baseada em 589 pb do COI. B) Rede de haplótipos baseada em 835 pb do Cytb. C) Rede de haplótipos baseada em 473 pb da Rodopsina. Nas redes, cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho representa sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos que diferem em uma mutação. Traços nas linhas representam mutações adicionais. As cores representam as localidades.

A diferenciação genética par-a-par com bases nos fragmentos mitocondriais foram congruentes entre si e ratificaram a estruturação apresentada nas redes de haplótipos (Tabelas 9 e 10). Para as populações da bacia do rio Almada não houve estruturação genética significativa ($p \geq 0,05$) entre as populações dos trechos médio e alto (ALT1, ALT2 e MED) ou entre as populações do baixo Almada (BAI1 e BAI2). Por outro lado, foi evidenciada uma estruturação genética muito alta ($F_{ST} > 0,25$) e significativa ($p \leq 0,05$) quando comparada as populações do baixo vs. médio+alto Almada (COI: 0,36-0,62; Cytb: 0,85–0,89).

Ao se comparar a população da bacia do rio de Contas com as demais, os valores de F_{ST} com base no COI e Cytb foram próximos a 100% e significativos, variando de 0,94 (CON-ALT2) a 0,99 (CONT-CAC) e de 0,95 (CON-ALT2) a 0,97 (CAC-CON), respectivamente (Tabelas 9 e 10). Quando as populações das bacias dos rios Cachoeira e Una foram comparadas entre si, valores altos e significativos de F_{ST} também foram observados (COI: 0,20 e Cytb: 0,26), porém bem inferiores aos encontrados entre as demais localidades (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9. F_{ST} para a par entre as localidades amostradas baseado em 589 pb do COI. ^{NS}: não significativo; * $p \leq 0,05$.

	ALT1	ALT2	MED	BAI1	BAI2	CONT	CAC	UNA
ALT1	0							
ALT2	-0,03220 ^{NS}	0						
MED	-0,01402 ^{NS}	-0,00657 ^{NS}	0					
BAI1	0,38542*	0,36576*	0,4061*	0				
BAI2	0,59586*	0,56848*	0,6297*	0,26921 ^{NS}	0			
CON	0,95196*	0,94657*	0,95730*	0,99102*	0,98866*	0		
CAC	0,96900*	0,96654*	0,97158*	0,98394*	0,98724*	0,99028*	0	
UNA	0,96617*	0,96400*	0,96828*	0,97690*	0,98285*	0,98586*	0,20013*	0

Tabela 10. F_{ST} para a par entre as localidades amostradas baseado em 835 pb do Cytb. ^{NS}: não significativo; * $p \leq 0,05$.

	ALT1	ALT2	MED	BAI2	CON	CAC	UNA
ALT1	0						
ALT2	-0,01874 ^{NS}	0					
MED	0,00612 ^{NS}	0,03468 ^{NS}	0				
BAI2	0,89746*	0,85949*	0,85678*	0			
CON	0,96586*	0,9535*	0,9537*	0,96276*	0		
CAC	0,97373*	0,96273*	0,96321*	0,97283*	0,97673*	0	
UNA	0,9685*	0,95805*	0,95884*	0,96506*	0,97099*	0,26842	0

A partição da variação genética dentro e entre as populações (AMOVA) considerando três níveis hierárquicos (condizentes com os grupos Almada; Contas; Cachoeira+Una evidenciado pelas análises anteriores) mostrou que aproximadamente 89% a 95% da variação genética são explicadas pela diferenciação entre os grupos (Tabela 11).

Tabela 11. Análise da Variância Molecular (AMOVA) entre os filogrupos Contas, Almada e Cachoeira+Una.

GL: Grau de liberdade; * $p \leq 0,05$.

Gene	Fonte de variação	GL	Percentual de variação%	Índice de Fixação
COI	Entre grupos	2	95,06	F_{CT} : 0,95056* F_{ST} : 0,96850*
	Entre localidades dentro de grupos	5	1,79	
	Dentro de localidades	100	3,15	
	Total	107		
Cytb	Entre grupos	2	89,09	F_{CT} : 0,89086* F_{ST} : 0,96322*
	Entre localidade dentro de grupos	4	7,24	
	Dentro de localidades	68	3,68	
	Total			

A SAMOVA mostrou que o agrupamento considerando quatro grupos é o que recupera a maior valor simultâneo de F_{ST} e F_{CT} para ambos os locos mitocondriais, com diferenças sutis entre os valores (Figura 17).

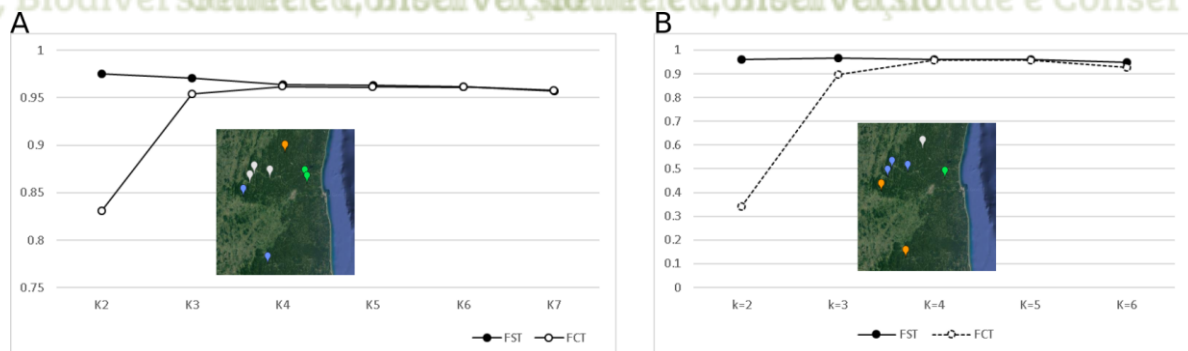


Figura 17. Análise de variância molecular espacial (SAMOVA). Estimativa de valores dos índices de fixação obtidos para o melhor agrupamento em cada k testado para o COI (A) e Cytb (B). O mapa em cada um dos gráficos reflete a configuração final que melhor representa o número de K após 1000 simulações de partições diferentes.

A estrutura populacional pelo método de BI implementada no software BAPS para o COI mostrou que a probabilidade *a posteriori* mais adequada para explicar a estruturação foi de

quatro clusters (Figura 18A). Em geral, foram recuperados os mesmos grupos evidenciados anteriormente, com a exceção de um agrupamento adicional composto por alguns dos indivíduos das localidades de COA, PFU e ALM (médio e alto Almada). Igualmente, a análise por BI para o Cytb recuperou quatro clusters (Figura 18B), congruentes com os filogrupos evidenciados pela rede haplotípica.

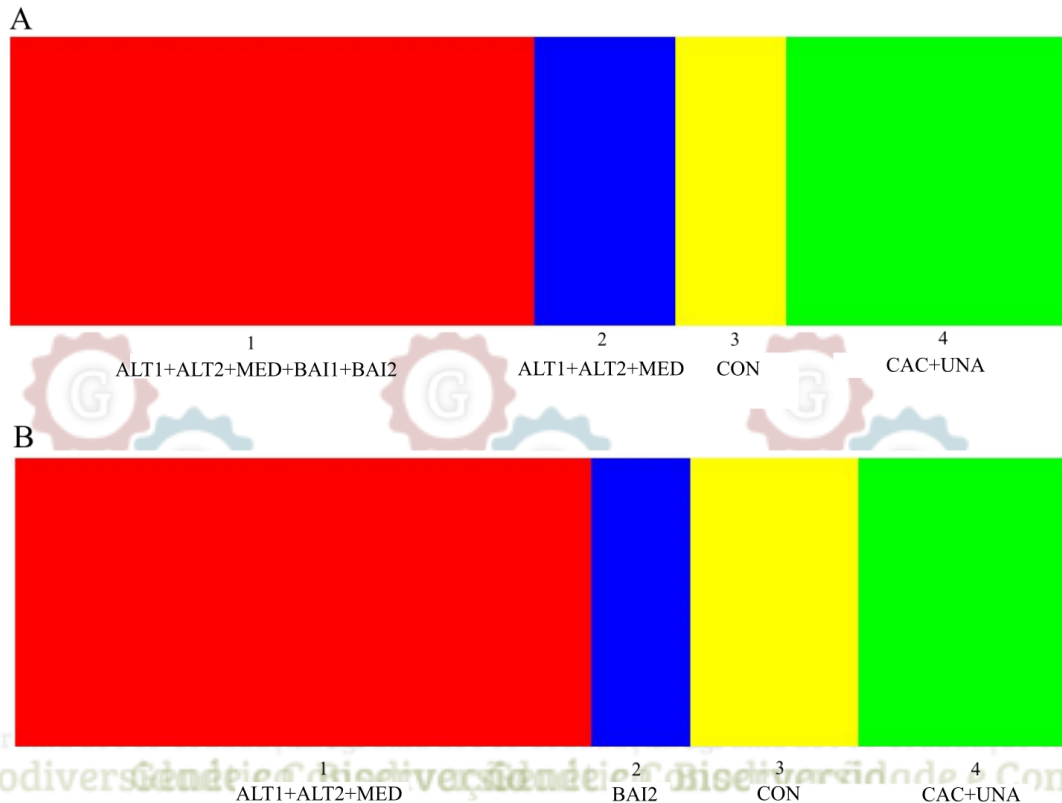


Figura 18. Análise Bayesiana da Estrutura Populacional (BAPS) baseado no gene COI (A) e Cytb (B). As cores representam *clusters* e a localidades estão representadas abaixo.

O teste de Mantel para averiguar a correlação entre distância genética e geográfica evidenciou uma correlação positiva e significativa, porém fraca, quando todas as amostras do presente estudo foram comparadas (Figura 19A, B). Frente às evidências anteriores de grupos genéticos distintos, o teste entre as localidades da bacia do Almada revelou uma forte correlação positiva e significativa ($r=0,8$ e $r=0,9$ para COI e Cytb, respectivamente) entre as distâncias genética e geográfica (Figura 18C, D). Não foi possível testar essa correlação para os grupos Contas e Cachoeira+Una, pois o teste de Mantel requer, no mínimo, três grupos para a análise.

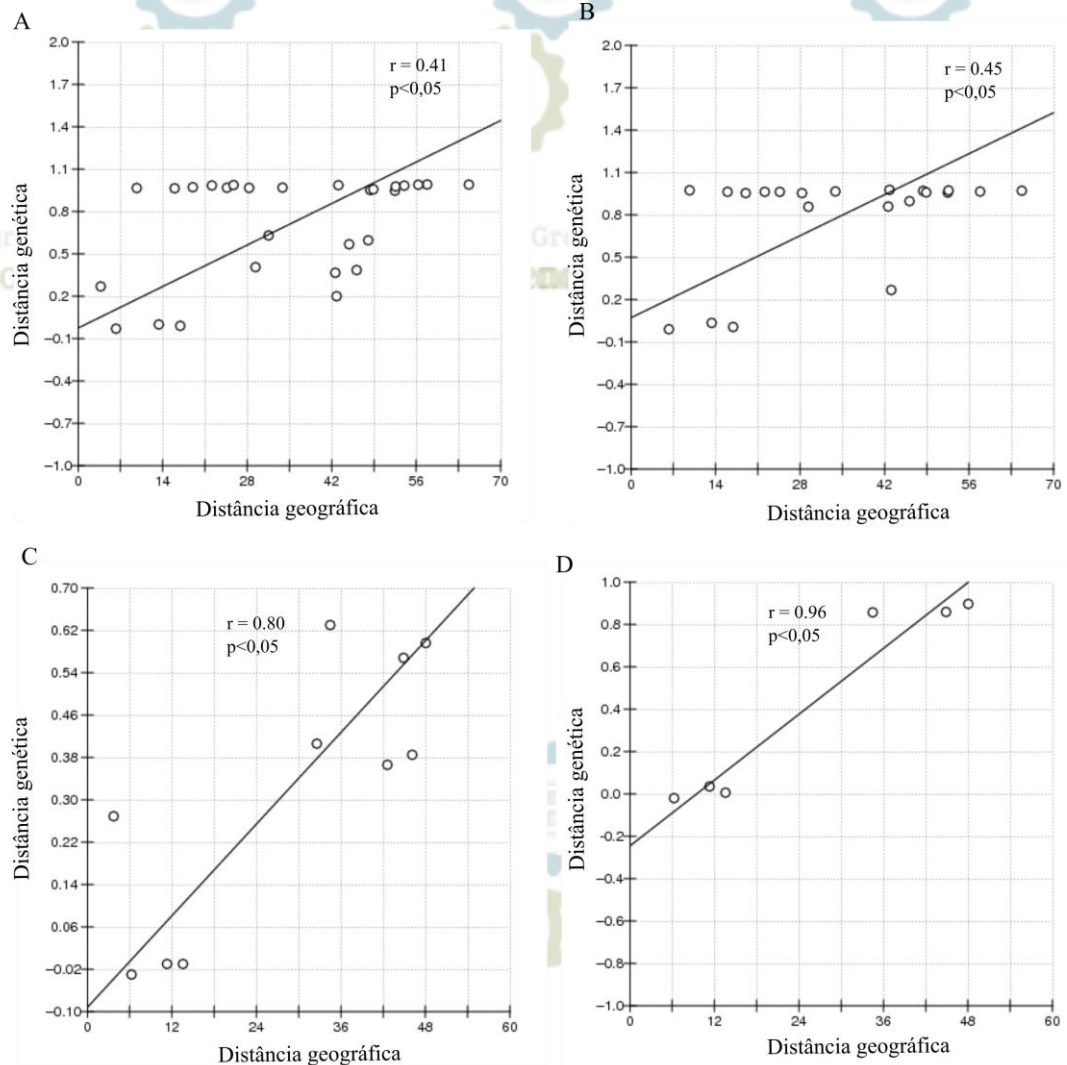


Figura 19. Teste de Mantel a partir de seqüências de COI (A, C) e Cytb (B, D) para todo o conjunto de dados (A, B) e para as localidades da bacia do rio Almada (C, D).

5.6. Parâmetros populacionais e análises de demografia histórica

O filogrupos Alto+Médio Almada foi o que apresentou maiores níveis de diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) para ambos os marcadores mitocondriais, enquanto menores níveis foram observados pelo filogrupos Contas. Os testes para detectar sinais de expansão não foram significativos, com exceção do valor de F_s de F_u para o filogrupos Alto+Médio Almada com base em seqüências do Cytb (Tabela 12).

A estimativa da demografia histórica com base nos fragmentos mitocondriais concatenados por EBSM evidenciou que o filogrupos Alto+Médio Almada teve uma discreta expansão no intervalo entre 80 a 40 mil anos atrás e posterior estabilidade populacional (Figura 20). Os demais filogrupos apresentaram estabilidade populacional ao longo do tempo.

Tabela 12. Parâmetros genéticos populacionais de COI e Cytb estimados para os filogrupos. N=Número de indivíduos; NH=Número de haplótipos; Hd=diversidade haplotípica; π =diversidade nucleotídica. ^{ns}: não significativo. * $p \leq 0,05$.

Filogrupos	COI								Cytb							
	N	S	NH	Hd	π	D de Tajima's	Fs de Fu	R ₂	N	S	NH	Hd	π	D de Tajima's	Fs de Fu	R ₂
Contas	13	1	2	0,154	0,00026	-1,14915 ^{ns}	-0,537 ^{ns}	0,2665 ^{ns}	12	4	5	0,803	0,00163	0,10377 ^{ns}	-1,132 ^{ns}	0,1590 ^{ns}
Baixo-AL	16	2	3	0,492	0,00089	-0,33010 ^{ns}	-0,290 ^{ns}	0,1570 ^{ns}	7	4	4	0,810	0,00205	0,23902 ^{ns}	-0,428 ^{ns}	0,1988 ^{ns}
Alto+Médio-AL	50	14	12	0,816	0,00366	-0,94216 ^{ns}	-3,301 ^{ns}	0,1570 ^{ns}	41	16	15	0,879	0,00266	-1,30167 ^{ns}	-7,238*	0,0664 ^{ns}
Cachoeira+Una	29	4	5	0,717	0,00192	0,29120 ^{ns}	-0,339 ^{ns}	0,1406 ^{ns}	15	9	5	0,733	0,00340	0,09509 ^{ns}	1,126 ^{ns}	0,1482 ^{ns}

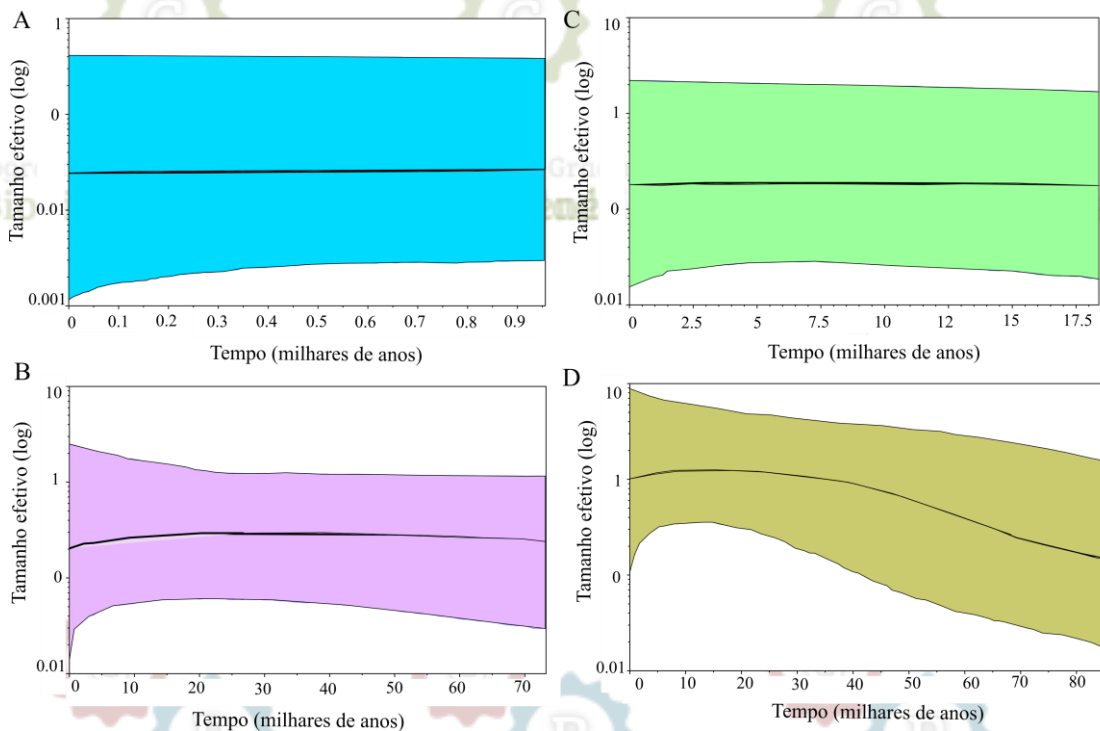


Figura 20. Estimativas do *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) para os filogrupos mitocondriais (COI+Cytb): A) Contas; B) Cachoeira+Una; C) Baixo Almada; D) Alto+Médio Almada. A linha do meio representa a mediana da estimativa, e as linhas superior e inferior indicam os limites acima e abaixo de 95% de HPD (*Highest Posterior Density*), respectivamente. O eixo Y está em escala logarítmica. O eixo X representa milhares de anos.

6. DISCUSSÃO

6.1. Aspectos taxonômicos e filogenéticos

O presente estudo é pioneiro no sentido de acessar a diversidade genética pouco conhecida de pequenos cascudos de drenagens costeiras do Leste. De fato, muito do conhecimento sobre esse grupo, incluindo *Parotocinclus*, está restrito às descrições originais. No entanto, muitos dos critérios morfológicos apontados são sutis e imprecisos para delimitar espécies (Armbruster, 2004; Cramer *et al.* 2011). Exemplificando, novas descrições e redescrições de gêneros e espécies para a subfamília Hypoptopomatinae tem sido recorrentes, incluindo casos de caracteres tidos como diagnósticos que mostram-se polimórficos ou estão presentes também em outros táxons (e.g. Reis *et al.*, 2012; Lehmann *et al.*, 2013, 2015; Ramos *et al.*, 2013, 2016, 2017; Roxo *et al.*, 2015a, 2015b, 2016a, 2016b).

Além das implicações taxonômicas, estudos subsequentes da ictiofauna Neotropical também apontam que muitas espécies previamente assumidas como endêmicas podem ser mais amplamente distribuídas de modo que as áreas de ocorrência também permanecem confusas para esse grupo (Garavello, 1977; Schaefer, 2003; Cardoso, 2010; Camelier & Zanata, 2014). De fato, uma taxonomia pouco precisa e erros sobre a área de distribuição afetam os regulamentos e o estado de conservação das espécies (Casciotta *et al.*, 2013). Nesse contexto, a utilização de marcadores moleculares torna-se uma ferramenta poderosa para acessar a diversidade e elucidar a história evolutiva do grupo.

As taxas de divergência entre os grupos aqui estudados expõem um cenário complexo de diversidade críptica (Tabelas 5 a 7). O chamado “*barcoding gap*” pressupõe que a distância genética entre grupos deve ser pelo menos 10 vezes maior que as distâncias dentro de cada grupo (Hebert *et al.*, 2003). Assim, quando a distância genética média intraespecífica para as populações dentro da área total de distribuição proposta para *P. cristatus* (4,5%) (Tabela 5) foi comparada com a distância média de espécies congêneras disponíveis nos bancos de dados (16,7%) (Tabela 7) observamos um “*barcoding gap*” de 3,7x, bem inferior ao limiar mencionado acima. Portanto, os indivíduos de *P. cristatus* de bacias costeiras da Bahia não parecem pertencer a uma mesma unidade genética.

Ao compararmos as sequências par a par (Tabela 6) nota-se a formação de três grupos com baixas distâncias genéticas dentro das localidades (0 a 0,5%), porém altamente divergentes entre si (valores 4,8 a 10,1%), a saber: (1) exemplares das bacias dos rios Cachoeira e Una, (2) populações da bacia do rio Almada e (3) população da bacia do rio de Contas. Nesse caso, a inferência do “*barcoding gap*” é aplicada, pois as distâncias genéticas entre os grupos são mais que 10 vezes as distâncias dentro de cada grupo. Portanto, as

distâncias genéticas em *P. cristatus* evidenciam uma diversidade críptica compatível com a existência de, pelo menos, três MOTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares) (Floyd *et al.*, 2002).

Corroborando esses dados, todos os algoritmos de delimitação de espécies testados recuperaram os mesmos grupos como unidades taxonômicas independentes (Figura 12). Vale ressaltar que para a análise bPTP houve uma tendência de atribuição taxonômica a cada ramo terminal quando utilizadas todas as sequências. Assim, o *input* final para o algoritmo bPTP incluiu somente os haplótipos mais representativos de cada localidade (Anexo 3). De fato, Blair e Bryson (2017) apontaram que o bPTP tende a atribuir um número irrealístico de espécies, conforme demonstrado a partir de um grande conjunto de dados de DNA mitocondrial variando a amostragem e a diversidade intraespecífica. Nesse mesmo estudo, os autores indicaram que os algoritmos mPTP (*Multi-rate Poisson Tree Process*) (Kapli *et al.*, 2017) e o ABGD seriam mais estáveis independentemente do *input*.

Do mesmo modo, Tang *et al.* (2014) recomendam o uso combinado do bPTP com o GMYC para gerar maior confiabilidade na separação de espécies em potencial, conforme realizado no presente estudo. Além desses, a análise de *cluster* disponível no BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007) também tem apresentado alta convergência com a análise de BINs. Esse método é igualmente considerado informativo para identificar MOTUs em estudos de DNA *barcode*, especialmente por não sofrerem viés das inferências filogenéticas. Assim, demonstra-se a importância da incorporação dos diferentes métodos para avaliar a riqueza de espécies em grupos controversos, como os cascudos da tribo Othyrini.

Assim como apontado nas análises de DNA *barcode*, as árvores de NJ, ML e BI recuperaram os três clados Contas, Almada e Cachoeira+Una com altos valores de suporte (Figuras 13, 14). A diferença entre esses clados é reforçada ainda pela AMOVA que evidenciou que a maior parte da variação genética é explicada pela diferenciação entre os três grupos (Tabela 11).

A única exceção foi o dendrograma baseado no gene da rodopsina que não distinguiu o grupo Contas, associando-o ao clado Almada (Figura 14). Essa topologia pode ser explicada pelo fato do marcador apresentar uma taxa evolutiva mais lenta e não conseguir diferenciar espécies estreitamente relacionadas (Behrens-Chapuis *et al.*, 2015). Por outro lado, a diferenciação genética conspícua observada mesmo para um gene mais conservado reforça a alta divergência do grupo Cachoeira+Una.

Adicionalmente, os três clados de *P. cristatus* apresentaram profundas divergências dos congêneres, com distâncias genéticas chegando a >20%. Esses valores são equivalentes ou

superiores às distâncias encontradas entre gêneros de Otothyriini (Tabela 7). Isso é refletido nos baixos valores de suporte das relações filogenéticas e na presença de politomias entre os representantes dessa tribo, cujas relações evolutivas permanecem confusas. De fato, a parafilia do gênero *Parotocinclus* e de outros gêneros de cascudinhos já tem sido reconhecida (Gauger & Buckup, 2005; Lehmann, 2006; Cramer *et al.*, 2007, 2011). Por exemplo, *Schizolecis guntheri*, uma das espécies que compôs a análise, foi recentemente realocada de Otothyriini para Neoplecostomini (Moreira *et al.*, 2017). Assim, hipóteses mais robustas sobre a filogenia e sistemática da tribo são necessárias a partir da inclusão de mais espécies nos bancos de dados e de análises multilocus.

O conjunto desses dados contraria a proposta de Roxo *et al.* (2017) de que a tribo Otothyriini apresentaria taxas constantes ou decrescentes de especiação quando comparadas aos demais Neoplecostominae. No entanto, generalizações dessa natureza são comprometidas, pois, conforme demonstrado nesse estudo, a biodiversidade de Hypoptopomatinae é ainda subrepresentada. Exemplificando, das 31 espécies descritas com base em caracteres morfológicos (Eschmeyer, 2017), somente 11 foram analisadas previamente por dados genéticos (Roxo *et al.*, 2017).

No entanto, o padrão aqui evidenciado concorda com a proposição de Roxo *et al.* (2014) sobre a diversificação de Otothyriini. Nesse estudo, os autores propõem que unidades evolutivas únicas são comumente encontradas para as bacias da plataforma sul-americana, com destaque para as drenagens costeiras do Atlântico. Dessa forma, as diferentes linhagens de *P. cristatus* aqui identificadas apóiam a hipótese de que essa região representaria o berço da diversificação dessa tribo de cascudinhos.

6.2. Aspectos filogeográficos

A estrutura filogeográfica recuperada pelos marcadores mitocondriais evidenciou quatro filogrupos (Figuras 16 a 18). Embora os grupos Contas e Cachoeira+Una tenham sido apoiados por todas as análises para os dois genes mitocondriais, as populações da bacia do rio Almada mostraram-se estruturadas.

Contudo, houve divergência entre os marcadores mitocondriais no padrão de estruturação dentro da bacia do rio Almada. Enquanto o Cytb permitiu diferenciar as amostras do baixo Almada em relação ao médio+alto Almada (Figura 18B), os dados de COI distinguiram alguns indivíduos simpátricos do médio e alto Almada (Figura 18A). Essa incongruência deve estar relacionada à alta sensibilidade do método BAPS a subdividir grupos que incluam alta diversidade de haplótipos, mas com poucas divergências nucleotídicas (Latch *et al.*, 2006).

Corroborando essa inferência, a rede haplotípica do COI (Figura 16A) revelou um padrão estrelado para as amostras do alto e médio Almada com a presença de vários haplótipos intimamente relacionados.

Independentemente dessas divergências, fica evidente que as populações do baixo Almada estão estruturadas em relação aos trechos superiores da bacia. Esses dados são reforçados pelos altos valores de índices de fixação entre essas localidades (Tabelas 9, 10). A alta correlação positiva e significativa entre distância genética e geográfica para as amostras dessa bacia também valida a estruturação populacional (Figura 19). Nesse caso, sugere-se um padrão de diferenciação do tipo *stepping-stone*, o qual prevê que a migração é frequentemente maior entre subpopulações que estão próximas umas das outras (Slatkin, 1987). A alta divergência das amostras do baixo Almada em relação aos trechos superiores pode ser favorecida pela grande distância geográfica (~ 38,71 km) entre os pontos. Em contrapartida, os pontos do alto e médio Almada são mais próximos geograficamente (~ 11,5 km) e, assumindo esse modelo, devem ter maior taxa de fluxo gênico resultando em estruturação não significativa.

De modo geral, esses dados são evidências de que os indivíduos dessa bacia tendem a acumular diferenças genéticas por alopatria. É provável que o aparente comportamento filopátrico e produção de ovos bentônicos que limitam a dispersão larval possam contribuir para a estruturação observada (Roxo *et al.*, 2014; Roxo *et al.*, 2017). Para confirmar essa hipótese, seria interessante amostrar outras populações ao longo dos trechos do médio e baixo Almada. O viés amostral também pode explicar o sinal de expansão (Figura 20) observado apenas para o filogrupos alto+médio Almada com dados de DNAmT, o qual poderia tender a superestimar o tamanho efetivo (Thomaz, 2015). Ainda, a elevada diversidade haplotípica do Cytb deve ter sido determinante para o padrão (Tabela 12) tendo em vista que somente esse marcador apresentou valor significativo de F_s de F_u .

Diferentemente dos genes mitocondriais, a análise do fragmento da rodopsina (Figura 16C) só distinguiu as amostras das bacias dos rios Cachoeira+Una das demais. Tal fato é atribuído a maior capacidade dos marcadores de DNAmT em revelar sinais de estruturação sutis devido ao padrão de herança matrilinear tornando-os mais suscetíveis aos efeitos de eventos históricos (Zink & Barrowclough, 2008). Novamente, o padrão de diferenciação dos marcadores nucleares em conjunto com os mitocondriais ressalta a alta diferenciação genética do clado Cachoeira+Una. Esse filogrupos compartilha haplótipos únicos e altamente diferenciados dos demais, o que contradiz a grande distância geográfica (43,1 km) entre os

locais de coleta nas bacias dos rios Cachoeira e Una e o fato deles pertencerem a sistemas hidrográficos distintos.

Essa divergência entre as linhagens dos grupos Cachoeira+Una e Contas+Almada pode ser explicada pelo alto tempo de divergência estimado por volta de 4,2 Ma. (Plioceno inferior) (Figura 15). Assim, é possível que o filogrupos Cachoeira+Una tenha acumulado maior número de mutações, conforme na rede de haplótipos (45 passos mutacionais). Por outro lado, a menor distância genética entre o grupo Contas e Almada seria relacionada à divergência mais recente entre ambas (2,3 Ma.), enquanto a estruturação entre as linhagens do baixo e alto+médio Almada remontam há 800 mil anos (Pleistoceno).

Esses resultados demonstram que o panorama biogeográfico para *Parotocinclus* das bacias do leste é mais complexo do que o imaginado por estudos ictiofaunísticos anteriores. Considerando que o primeiro grupo a divergir é representado pelas linhagens Cachoeira+Una, pode-se inferir que após a dispersão, eventos vicariantes separaram essa linhagem das demais. Apoiando essa hipótese, o Plioceno inferior, estimado como período de divergência entre os grupos Cachoeira+Una e Almada+Contas, é caracterizado por clima quente com consequente elevação do nível do mar (Weitzman *et al.*, 1988). Assim, sistemas fluviais antes conectados e favoráveis à dispersão desses cascudinhos, reconhecidos pela plasticidade ambiental (Cetra *et al.*, 2009), podem ter sido isolados nesse período, acumulando as divergências genéticas encontradas.

Por outro lado, a similaridade genética entre as populações das bacias do rio Cachoeira e Una é explicada pelo padrão das drenagens com indícios de sucessivos eventos de captura de tributários entre ambas (presença de cotovelos e proximidade geográfica entre os afluentes) e formação geológica parcialmente compartilhada (formação Barreiras) (Nacif, 2000). Além desses fatores, a bacia do rio Una apresenta relevo menos acidentado que a bacia do rio Cachoeira, com grandes variações de altitude entre ambas (DePaula *et al.*, 2012). Essa diferença de relevo favorece processos de captura de cabeceiras por recuo (Christofolletti, 1975; Bishop, 1995) da bacia de maior altitude (Cachoeira) para o sistema fluvial de baixa altitude (Una).

Surpreendentemente, a bacia do rio Almada mostrou filogrupos claramente distintos daqueles identificados nas bacias dos rios Cachoeira e Una, contrariando inferências baseadas em endemismo de fauna usando critérios morfológicos (Camelier & Zanata, 2014) e a expectativa com base nas distâncias geográficas, particularmente entre Almada e Cachoeira. De fato, houve maior similaridade entre os filogrupos das bacias dos rios Almada e Contas,

provavelmente relacionada às intensas atividades neotectônicas na margem atlântica do Brasil (Saadi *et al.*, 2002) no período estimado de divergência desses grupos (Pleistoceno).

Corroborando essa ideia, a fotointerpretação do padrão do sistema fluvial da bacia do Almada evidencia uma estreita relação com a bacia do rio de Contas (Anexo 4). O sistema hidrográfico Almada apresenta uma retilinearidade assimétrica, isto é, os afluentes estão concentrados na margem esquerda (ao norte) a qual se caracteriza por um número maior de anomalias, como curvaturas abruptas (cotovelos) e meandramentos locais (Christofolletti, 1975; Bishop, 1995). Tais padrões sugerem intensa atividade geológica e o favorecimento de mais eventos de capturas fluviais entre as bacias dos rios de Contas e Almada do que desse último com as bacias vizinhas mais ao sul. No geral, esses dados demonstram que inferir padrões biogeográficos apenas com dados morfológicos da ictiofauna Neotropical e sem interpretação da história geológica das bacias pode levar a conclusões pouco realísticas.



7. CONCLUSÕES

As evidências aqui levantadas permitiriam traçar as seguintes conclusões:

1. A espécie *Parotocinclus cristatus* inferida para ter distribuição restrita para as bacias dos rios de Contas, Almada, Cachoeira e Una parece constituir um complexo de espécies crípticas, composta por três MOTUs com profundas divergências genéticas;
2. Os indivíduos coletados nas bacias dos rios Cachoeira e Una constituem uma única MOTU que divergiram cedo na história evolutiva do grupo e, por isso, acumularam profundas distâncias genéticas;
3. A MOTU das bacias dos rios Almada e Contas divergiram mais recentemente e, por isso, são mais estreitamente relacionados o que é apoiado pelo maior número de prováveis capturas de drenagens entre essas bacias pelas análises geomorfológicas;
4. A bacia do rio Almada abriga uma MOTU exclusiva (endêmica) e altamente estruturada entre o terço alto e baixo da bacia, compatível com o modelo *stepping-stone*, indicando diferenciação alopátrica dentro de um mesmo sistema hidrográfico;
5. Confirmando a hipótese inicial desse trabalho, as características biológicas de *Parotocinclus* mostraram-se úteis para inferências filogeográficas, revelando padrões surpreendentes, tais como maior diferenciação dentro de bacias (Almada) que entre sistemas adjacentes e que bacias contíguas podem conter grupos geneticamente mais divergentes entre si (e.g. Cachoeira e Almada) que outras hipoteticamente menos relacionadas. Esses dados indicam que a biogeografia dos rios costeiros da Bahia é altamente complexa, sugerindo cautela no uso de distâncias geográficas e desenho atual das bacias para estimar relações evolutivas entre as mesmas.
6. Os altos níveis de endemismo e diferenciação genética em *Parotocinclus* das bacias costeiras do Leste, associados com a alta degradação ambiental dessas áreas justificam a importância desses sistemas hidrográficos como áreas prioritárias para a conservação com a efetivação de esforços concretos de recuperação dos habitats e proteção das comunidades de espécies que aí vivem.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). 2015. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: regiões hidrográficas brasileiras. Edição Especial. Brasil: Brasília, DF. 164 p.
- ALBERT, JS & REIS, AR. 2011. In: ALBERT, JS & REIS, RE. (Ed). Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. University of California Press, Berkeley, p. 3-19.
- ARMBRUSTER, JW. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armored catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. Zoological Journal of the Linnean Society, vol. 141, p. 1-80.
- AVISE, JC. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge: Harvard University Press. 384p.
- AVISE, JC.; ARNOLD, J.; BALL, RM.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, JE.; REEB, CA. & SAUNDERS, NC. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between Population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, vol.18, p. 489-522.
- BAGGIO, RA.; STOIEV, SB.; SPACH, HL. & BOEGER, WA. 2017. Opportunity and taxon pulse: the central influence of coastal geomorphology on genetic diversification and endemism of strict estuarine species. Journal of Biogeography, vol. 44, no. 7, p. 1626–1639.
- BANDELT, H.; FORSTER P, & RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, vol. 16, no. 1, p. 37–48.
- BATALHA-FILHO, H. & MIYAKI, CY. 2011. Filogeografia da Mata Atlântica. Revista da Biologia, vol. 7, p. 31-34.
- BEHEREGARAY, LB; SUNNUCKS, P & BRISCOE, DA. 2002. A rapid fish radiation associated with the last sea level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. Proceedings of the Royal Society of London B, 269, 65-73. vol. 269, no. 1486. DOI: 10.1098/rspb.2001.1838.
- BEHRENS-CHAPUIS, SF.; HERDER, M.; GEIGER, H.; ESMAEILI, N.; HAMIDAN, M.; ÖZULUĞ & ŠANDA, R. 2015. Adding nuclear rhodopsin data where mitochondrial COI indicates discrepancies – can this marker help to explain conflicts in cyprinids? DNA Barcodes, vol. 3, no.1, p.187–199.
- BISHOP, P. 1995. Drainage rearrangement by river capture, beheading and diversion. Progress in Physical Geography, vol. 19, no. 4, p. 449 – 473.
- BITENCOURT, JA.; AFFONSO, PRAM.; GIULIANO-CAETANO, L. & DIAS, AL. 2011. Identification of distinct evolutionary units in allopatric populations of *Hypostomus* cf.

wuchereri Günther, 1864 (Siluriformes: Loricariidae): karyotypic evidence. Neotropical Ichthyology, vol. 9, nº. 2, p. 317-324.

BIZERRIL, CRSF. 1994. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. Acta Biologica Leopoldensia, vol.16, p. 51-80.

BLAIR, C. & BRYSON, JRW. 2017. Cryptic diversity and discordance in single-locus species delimitation methods within horned lizards (Phrynosomatidae: Phrynosoma). Molecular Ecology Resources, online. DOI: 10.1111/1755-0998.12658.

BLESSING, JJ.; MARSHALL, JC. & BALCOMBE, SR. 2010. Humane killing of fishes for scientific research: a comparison of two methods. Journal of Fish Biology, vol. 76, no. 10, p. 2571-2577.

BORBA, R. S.; ZAWADZKI, C. H; OLIVEIRA, C.; PERDICES, A; PARISE-MALTEMPI, PP. & ALVES, AL. 2013. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Osteichthyes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the Upper Paraná River basin. Neotropical Ichthyology, vol. 11, no. 1, p. 111-116.

BRITO, PH. & EDWARDS, SV. 2009. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. Genetica, vol.135, no. 3, p. 439-455.

BRITSKI, HA. 1981. Peixes de água doce. In: CARVALHO, JCM. (Coord). Atlas da fauna brasileira. São Paulo: Melhoramentos. p. 84-93.

BUCKUP, PA.; MENEZES, NA. & GHAZZI, MS. 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. 6ª ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 195p.

BUENO-SILVA, M. 2012. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. Estudos de Biologia, vol. 34, no. 83. p. 157-163.

BULLERWELL, CE. & GRAY, MW. 2004. Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. Current Opinion in Microbiology, vol. 7, no. 5, p. 528-34.

BURGER, R.; ZANATA, AM. & CAMELIER, P. 2011. Taxonomic study of the freshwater ichthyofauna from Recôncavo Sul basin, Bahia, Brazil. Biota Neotropica, vol. 11, no. 4, p. 273–290.

CAMELIER, P. & ZANATA, AM. 2014. Biogeography of freshwater fishes from the Northeastern Mata Atlântica freshwater ecoregion: distribution, endemism, and area relationships. Neotropical Ichthyology, vol. 12, no.4, p. 683-698.

CARDOSO, PCA. 2010. Estudo taxonômico e aspectos biogeográficos da ictiofauna de água doce de drenagens costeiras do Estado da Bahia, Brasil, com a descrição de seis espécies novas. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

Departamento de Zoologia. Programa de Pós-graduação em Diversidade Animal. 222p.

CARDOSO, PCA. 2016. Especiação e biogeografia nos gêneros *Glandulocauda* Eigenmann e *Mimagoniates* Regan (Characidae: Stevardiinae: Glandulocaudini). Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Taxonomia e Biodiversidade, Museu de Zoologia da USP. 244 p.

CARVALHO, DC.; OLIVEIRA, DAA.; POMPEU, PS.; LEAL, CG.; OLIVEIRA, C. & HANNER, R. 2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River Basin. *Mitochondrial DNA*, vol. 22, p. 80-86.

CARVALHO, PH.; LIMA, SMQ.; ZAWADZKI, CH.; OLIVEIRA, C. & DE PINNA, M. 2015. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region, *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, vol 27, no. 5, p. 3590-3596.

CASCIOTTA, J.; ALMIRÓN, A.; SÁNCHEZ, S.; IWASZKIW, J. & BRUNO, MC. 2013. The genus *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) in Argentina. How bad taxonomy results in poor regulations and no conservation. *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 29, no. 1, p. 208–212.

CASTRO, R.M.C. 1999. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: CARAMASCHI, EP.; MAZZONI, R. & PERES-NETO, PR (eds.). *Ecologia de Peixes de Riachos, Série Oecologia*. Vol. VI. PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. p. 1-22.

CASTRO, RMC. & JUCÁ-CHAGAS, R. 2008. *Lygnobrycon myersi* (Miranda-Ribero, 1956). In: Ministério do Meio Ambiente (Ed.) *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*, vol. II. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, p. 75-77.

CETRA, M.; FERREIRA, FC. & CARMASSI, AL. 2009. Caracterização das assembléias de peixes de riachos de cabeceira no período chuvoso na bacia do rio Cachoeira (SE da Bahia, NE do Brasil). *Biota Neotropica*, Campinas, vol. 9, no. 2, p.107-115.

CETRA, M.; SARMENTO-SOARES, LM. & MARTINS-PINHEIRO, RF. 2010. Peixes de riachos e novas Unidades de Conservação no sul da Bahia. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, vol. 5, no.1, p. 11-21.

CHRISTOFOLETTI, A. 1975. Capturas fluviais. *Enciclopédia Mirador Internacional*, São Paulo, vol. 5, p. 2.049-2.051.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P.; SIRÉN, J. & TANG, J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC*

Bioinformatics, vol. 9, no. 1, p. 539.

CRAMER, CA.; BONATTO, SL. & REIS, RE. 2011. Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 59, no.1, p. 43-52.

CRAMER, CA.; LIEDKE, SL.; BONATTO, SL. & REIS, RE. 2007. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *Journal of Fish Biology*, vol. 9, p. 51-59.

CRISCI, JV.; KARINAS, L. & POSADAS, P. 2003. *Historical Biogeography: an introduction*. Cambridge: Harvard University Press. 250 p.

CROWLEY, TJ. 1996. Pliocene climates: the nature of the problem, *Marine Micropaleontology*, vol. 27, no. 1, p. 3-12.

DePAULA, FCF.; SILVA, DML. & SOUZA, CM. 2012. Tipologias Hidroquímicas das Bacias Hidrográficas do Leste da Bahia. *Revista Virtual de Química*. vol. 4, no. 4, p. 365-373.

DRUMMOND, A.; SUCHARD, MA.; XIE, D. & RAMBAUT, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 29, no. 8, p. 1969–1973.

DUPANLOUP, I.; SCHNEIDER, S. & EXCOFFIER, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, vol. 11, no. 12, p. 2571-2581.

EDWARDS, SV. & BEERLI, P. 2000. Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, vol. 54, no. p.1839-1854.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. 2006. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2º ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 306 p.

EMSLEY, MG. 1965. Speciation in *Heliconius* (Lep., Nymphalidae): Morphology and geographic distribution. *Zoologica*, vol. 50, p. 191-254.

ENDLER, J. 1982. Pleistocene forest refuges: fact or fancy? In: PRANCE, G.T. (Ed.). *Biological Diversification in the Tropics*. New York: Columbia University Press. p. 179-200.

ESCHMEYER, WN.; FRICKE, R. & VAN DER LAAN, R. (eds). *Catalog Of Fishes: Parotocinclus*. Disponível em:

<<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>.

Acesso em 11 de Julho de 2017.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, PE. & QUATTRO, JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, vol. 131, no. 2, p. 479-491.

FARIAS, IP. & HRBEK, T. 2008. Patterns of diversification in discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 49, no. 1, p. 32-43.

FILHO, CAR. 1976. Recursos hídricos. Diagnóstico Sócio-Econômico da Região Cacaueira. 5 ed^a. Rio de Janeiro: Convênio IICA/CEPLAC. 133p.

FLOYD, R.; EYUALEM, A.; PAPERT, A. & BLAXTER, ML. 2002 Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, vol. 11, no. 4, p. 839–850.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ R, & VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, vol. 3, no. 5, p. 294–299.

FRANCO, GB.; SOUZA, CMP.; BETIM, LS.; MARQUES, EAG.; GOMES, RL. & CHAGAS, CS. 2011. Diagnóstico ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Almada (BA). *Revista Geografia (Londrina)*, vol. 20, no. 3, p. 71-94.

FU, YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, vol. 147, no. 2, p. 915–925.

FUJISAWA, T. & BARRACLOUGH, TG. 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Systematic Biology*, vol. 62, no. 5, p. 707–724.

GARAVELLO, JC. 1977. Systematics and geographical distribution of the genus *Parotocinclus* Eigenmann & Eigenmann, 1889 (Ostariophysi, Loricariidae). *Arquivos de Zoologia*, vol. 28, no. 4, p. 1-37.

GARAVELLO, JC. 1988. Three new species of *Parotocinclus* Eigenmann & Eigenmann, 1889 with comments on their geographical distribution (Pisces, Loricariidae). *Naturalia*, vol. 13, p. 117-128.

GAUGER, MFW. & BUCKUP, PA. 2005. Two new species of Hypoptopomatinae from the rio Paraíba do Sul basin, with comments on the monophyly of *Parotocinclus* and the Otothyriini (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, vol 3, p. 509-518.

GEERINCKX, T.; BRUNAIN M.; HERREL A.; AERTS P. & ADRIAENS, D. 2007. A head with a suckermouth: a functional-morphological study of the head of the suckermouth catfish *Ancistrus* cf. *triradiatus* (Loricariidae, Siluriformes). *Belgian Journal of Zoology*, vol. 137, no. 1, p. 47–66.

- GERY, J. 1969. The fresh-water fishes of South America. Monographs Biology, vol. 19, p. 828-848.
- GOMES, LC.; PESSALI, TC.; SALES, NG.; POMPEU, OS. & CARVALHO, DC. 2015. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a Neotropical river basin. *Genetica*, vol.143, p. 581-588.
- GOMES, RL.; MORAES, MEB.; MOREAU, MAS.; MOREAU, MS.; FRANCO, GB & MARQUES, EAG. 2012. Aspectos físico-ambientais e de uso e ocupação do solo da bacia hidrográfica do rio Almada-BA. *Boletim de Geografia*, vol. 30, no. 2, p. 45-57.
- HAFFER, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, vol.165, p. 131-37.
- HALL, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, p. 95-98.
- HEBERT, PDN.; CYWINSKA, A.; BALL, SL. & WAARD, JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, vol. 270, nº. 1512, p. 313-321.
- HEBERT, PDN.; RATNASINGHAM, S, & DEWAARD, JR. 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol.270, p. 596–S599.
- HEBERT, PDN.; STOECKLE, MY.; ZEMLAK, TS & FRANCIS, CM. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, vol. 2, nº .10, p. 1657-1663.
- HELED, J & DRUMMOND AJ. 2008. Bayesian inference of population size history from. *BMC Evolutionary Biology*, vol. 8, p. 289.
- HUBERT, N. & RENNO, JF. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, vol. 33, no. 8, p. 1414–1436.
- HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; RIVERA, R.; BONHOMME, F. & RENNO, JF. 2007a. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. *Molecular Ecology*, vol.16, no.12, p. 2488-2503.
- HUBERT, NF.; DUPONCHELLE, JNC.; GARCIA-DAVILA, D.; PAUGY, D. & RENNO, JF. 2007b. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, vol.16, no.10, p. 2115-2136.
- HUELSENBECK, J & P. RONQUIST, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics*, vol.17, no. 8 , p. 754–755.
- INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS (INEMA). Comitês de

Bacias, CBH Contas. Disponível em: < <http://www.inema.ba.gov.br/gestao-2/comites-de-bacias/comites/cbh-contas/> >. Acesso em 12 de Julho de 2017.

IVANOVA, NV, ZEMLAK, TS, HANNER, RH & HEBERT PDN. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, vol. 7, nº. 4, p. 544-548.

JENSEN, JL., BOHONAK, AJ. & KELLEY, ST. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.23. Disponível em < <http://ibdws.sdsu.edu/> > Acesso em 19 de Julho de 2017.

KAPLI, P.; LUTTEROPP, S.; ZHANG, J; KOBERT, K.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A. & FLOURI, T. 2017. Multi-rate Poisson Tree Processes for single-locus species delimitation under Maximum Likelihood and Markov Chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, vol. 33, no. 11, p. 1630-1638.

KAVALCO, KF; PAZZA, R; BRANDÃO, KDO, GARCIA, C. & ALMEIDA-TOLEDO, LF. 2011. Comparative Cytogenetics and Molecular Phylogeography in the Group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 134, no. 2, p. 108-119.

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, vol. 16, nº. 2, p.111–120.

KUHNER, MK. 2009. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 24, no. 2, p. 86-93.

LATCH, EK.; DHARMARAJAN, G.; GLAUBITZ, JC & RHODES JR, OE. 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetic*, vol.7, no. 2, p. 295–302.

LEHMANN A., P. 2006. Anatomia e relações filogenéticas da família Loricariidae (Ostariophysi: Siluriformes) com ênfase na subfamília Hypoptopomatinae. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Tese (Doutorado em Zoologia). 419p.

LEHMANN A., P.; BRAUN, BK.; PEREIRA, EHL. & REIS, RE. 2013 A New Species of the Hypoptopomatinae Catfish *Parotocinclus* (Siluriformes: Loricariidae), from the Headwaters of the Rio Jequitinhonha, Brazil. *BioOne*, vol.2013, no. 3, p. 435-440.

LEHMANN, AP.; SCHVAMBACH, LJ. & REIS, RE. 2015. A new species of the armored catfish *Parotocinclus* (Loricariidae: Hypoptopomatinae), from the Amazon basin in Colombia. *Neotropical ichthyology*, Maringá, vol. 13, no. 1, p. 47-52.

LIBRADO, P & ROZAS J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA

polymorphism data. *Bioinformatics*, vol. 25, no. 11, p. 1451-1452.

LOVEJOY, NR. & ARAÚJO, MLG. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*, *Molecular Ecology*, vol. 9, p. 259-268.

LUJAN, NK.; ARMBRUSTER, JW.; LOVEJOY, NR. & LOPEZ-FERNANDEZ, H. 2015. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 82, p. 269–288.

LUNDBERG, JG.; MARSHALL, LG.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, MCSL. & WESSELINGH, F. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: MALABARBA, L.R.; REIS, RE.; VARI, RP.; LUCENA, ZMS. & LUCENA, CAS. 1998. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDUPUCRS. p. 13-48.

MAGGIA, ME.; VIGOUROUX, Y.; RENNO, JF.; DUPONCHELLE, F.; DESMARAIS, E.; NUNEZ, J.; GARCÍA-DÁVILA, C.; CARVAJAL-VALLEJOS, FM.; PARADIS, E.; MARTIN, JF. & MARIAC, C. 2017. DNA Metabarcoding of Amazonian Ichthyoplankton swarms. *Plos One*, vol.12, no. 1. p. e0170009.

MALLO, D & POSADA, D. 2016. Multilocus inference of species trees and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol.371, no. 1702. DOI: 10.1098/rstb.2015.0335.

MARKERT, JA.; SCHELLY, RC. & STIASSNY, MLJ. 2010. Genetic isolation and morphological divergence mediated by high-energy rapids in two cichlid genera from the lower Congo rapids. *BMC Evolutionary Biology*, vol. 10, no. 1. DOI: 10.1186/1471-2148-10-149.

MARTINS, FM. & DOMINGUES, MV. 2011. Filogeografia. In: CARVALHO, CJB., ALMEIDA, EAB. (Eds). 2011. *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. São Paulo: Roca. 306p.

MEDRADO, AS.; AFFONSO, PRAM.; CARNEIRO, PLS.; VICARI, MR.; ARTONI, RF. & COSTA, MA. 2015. Allopatric divergence in *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Characidae, Incertae sedis) inferred from DNA mapping and chromosomes. *Zoologischer Anzeiger*, vol. 257, p. 119–129.

MEDRADO, AS.; RIBEIRO, MS.; AFFONSO, PRAM.; CARNEIRO, PLS. & COSTA, MA. 2012. Cytogenetic divergence in two sympatric fish species of the genus *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Characiformes, Characidae) from northeastern Brazil. *Genetics and Molecular*

Biology, vol. 35, no. 4, p. 797-801.

MILLER, MA.; PFEIFFER, W. & SCHWARTZ, T., 2010. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, p.1–8.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). 2006. Caderno da região hidrográfica Atlântico Leste. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos (Ed.), Brasília, DF. 156 p.

MONTOYA-BURGOS, JI. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, vol. 12, no.7, p.1855-1867.

MOREIRA, DA.; BUCKUP, PA.; FURTADO, C.; VAL, AL.;SCHAMA, R & PARENTE, TE. 2017. Reducing the information gap on Loricarioidei (Siluriformes) mitochondrial genomics. *BMC Genomics*, vol. 18, no.345. DOI:10.1186/s12864-017-3709-3.

NACIF, PGS. 2000. Ambientes naturais da bacia hidrográfica do rio Cachoeira, com ênfase nos domínios pedológicos. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. Tese de Doutorado. 118 p.

NELSON, JS. 2006. *Fishes of the World*. 4 ed. New York: John Willey & Sons. 601p.

NETTO, AST & SANCHES, CP. 1991. Roteiro geológico da bacia do Almada, Bahia. *Revista Brasileira de Geociências*, vol. 21, no. 2, p. 173-184.

OLIVEIRA, D. 2010. Capturas fluviais como evidências da evolução do relevo: uma revisão bibliográfica. *Revista do Departamento de Geografia*, vol. 20, p. 37-50.

OLIVEIRA, IA.; ARGOLO, LA.; BITENCOURT, JA.; DINIZ, D.; VICARI, MR. & AFFONSO, PRAM. 2016. Cryptic chromosomal diversity in the complex “*Geophagus*” *brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). *Zebrafish*, vol. 13, no.1, p. 33-44.

OLIVEIRA, MCRA. 1997. As relações Ambientais da Bacia do Rio Cachoeira (Sul da Bahia). Ilhéus-BA: Editus. 112 p.

ORNELAS-GARCÍA, CP.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O. & DOADRIO, I. 2008. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 340–357.

PAGE, RDM. 2016. DNA barcoding and taxonomy: dark taxa and dark texts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, vol. 371, no. 1702. DOI: 10.1098/rstb.2015.0334.

PATTON, JL. & DA SILVA, MNF. 1998. Rivers, refuges and ridges: the geography of

speciation of Amazonian mammals. In: BERLOCHER, S & HOWARD, D. (Eds) *Endless forms: Species and speciation*. New York: Oxford University Press, 202p.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A. & DOADRIO, I. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei:Pimelodidae) in Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 25, no.1, p.172-189.

PEREIRA, LHG.; HANNER, R.; FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, vol.14, n° 20, p.1-14.

PEREIRA, LHG.; MAIA, GMG.; HANNER, R.; FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. 2011. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, vol. 22, p.71–79.

PIGGOTT, MP.; CHAO, NL. & BEHEREGARAY, LB. 2011. Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 102, no. 2, p. 391–403.

PONS, J.; BARRACLOUGH, TG.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.; DURAN, DP.; HAZELL, S.; KAMOUN, S.; SUMLIN WD. & VOGLER, AP. 2006. Sequence based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, vol. 55, no.4, p. 595–609.

POSADA, D & KA. CRANDALL. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, vol. 14, no. 9, p. 817-818.

PULLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S. & ACHAZ, G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, vol. 21, no. 8, p. 1864-1877.

RAMBAUT, A. & DRUMMOND, AJ. 2015. TreeAnnotator v1.8.2: MCMC Output analysis. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, MA.; XIE, W. & DRUMMOND, AJ. 2013. Tracer v.1.6.0: MCMC Trace Analysis Tool. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.

RAMOS, TPA., BARROS-NETO.; BRITSKI, LF.; HERALDO A. & LIMA, SMQ. 2013. *Parotocinclus seridoensis*, a new hypoptopomatine catfish (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Piranhas-Açu basin, northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, vol. 11, no. 4, p.787-796.

RAMOS, TPA.; LEHMANN, A., BARROS-NETO, P.; LUCIANO, F., & LIMA, SMQ. 2016. Redescription of the endangered hypoptopomatine catfish *Parotocinclus spilurus* (Fowler, 1941) (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Jaguaribe basin, northeastern

Brazil. Neotropical Ichthyology, vol. 14, no. 1. e150098.

RAMOS, TPA.; LIMA, SMQ & RAMOS, RTC. 2017. A new species of armored catfish *Parotocinclus* (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Parnaíba basin, northeastern, Brazil. Neotropical ichthyology, vol. 15, no. 2. e160153.

RAMOS-ONSINS, SE. & ROZAS, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. Molecular Biology and Evolution, vol.19, no. 12, p. 2092–2100.

RATNASINGHAM, S. & HEBERT, PDN. 2007. Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). Molecular Ecology Notes, vol. 7, n° .3, p. 355–364.

RATNASINGHAM, S. & HEBERT, PDN. 2013. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. PLoS One, vol. 8, n°. 7, p. e66213.

REIS, RE.; KULLANDER, SO. & FERRARIS JR, CJ. 2003. Check list of the freshwater fishes of south and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS. 742p.

REIS, RE.; PEREIRA, EHL & LEHMANN, PA. 2012. A new genus and species of Hypoptopomatine catfish (Siluriformes: Loricariidae) from the upper Rio São Francisco basin, Brazil. BioOne, vol. 2012, no. 1, p. 6–11.

RIBEIRO, AC. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. Neotropical Ichthyology, vol. 4, no. 2, p. 225-246.

ROSA, AJM. & PAIVA, SR. 2009. Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. Embrapa Cerrados, vol. 1, p. 2176-5081.

ROSA, RS. & LIMA, FCT. 2008. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: MACHADO, ABM.; DRUMMOND, GM. & PAGLIA, AP. (Eds.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, Brasília: Ministério do Meio Ambiente. p. 9- 275.

ROXO, F.; ALBERT, JS.; SILVA, GSC.; ZAWADZKI, CH. & FORESTI, F. 2014. Molecular phylogeny and biogeographic history of the armored Neotropical catfish Subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyriinae (Siluriformes: Loricariidae). PLoS One, vol. 9, no. 8, p. e105564.

ROXO, FF.; LUJAN, NK.; TAGLIACOLLO, VA.; WALTZ.; BT.; SILVA, GSC.; OLIVEIRA, C. & ALBERT, JS. 2017. Shift from slow- to fast-water habitats accelerates lineage and phenotype evolution in a clade of Neotropical suckermouth catfishes (Loricariidae: Hypoptopomatinae). PLoS One, vol. 12, no.6, p. e0178240.

ROXO, FF.; MELO, BF.; SILVA, GSC & OLIVEIRA, CLAUDIO. 2017. New species of *Parotocinclus* (Siluriformes: Loricariidae) from coastal drainages of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. Zootaxa, vol. 4232, no. 2, p. 260–270.

ROXO, FF.; SILVA, GSC & OLIVEIRA, C. 2015a. A new species of *Hisonotus* (Siluriformes, Loricariidae) from rio São Francisco basin, Brazil. *ZooKeys*, vol.498, p. 127–143.

ROXO, FF.; SILVA, GSC & OLIVEIRA, C. 2016a. Description of a new species of *Parotocinclus* (Siluriformes, Hypoptopomatinae) from the rio Tapajós basin. *ZooKeys*, vol.634, p. 125–136.

ROXO, FF.; SILVA, GSC.; OCHOA, LE. & OLIVEIRA, C. 2015b. Description of a new genus and three new species of Otothyrinae (Siluriformes, Loricariidae). *ZooKeys*, vol. 534, p.103–134.

ROXO, FF.; SILVA, GSC.; WALTZ, BT & MELO, JE. 2016b. A new species of *Hisonotus* (Siluriformes: Otothyrinae) from the upper rio Paraná and rio São Francisco basins, Brazil. *Zootaxa*, vol. 4109, no. 2, p. 227-38.

SAADI, A.; MACHETTE.; MN, HALLER.; KM.; DART RL, BRADLEY, L, & SOUZA, AMPD. 2002. Map and Database of Quaternary Faults and Lineaments in Brazil. U.S. Geological Survey Open-File Report 02-230, Version 1.0. Disponível em: < <http://pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-230/>. > Acesso em 05 de Julho de 2017.

SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, vol. 4, n°. 4, p. 406–425.

SANGER, F.; NICHLEN, S. & COULSON, AR. 1977. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 74, no.12, p. 5463-5467.

SANTOS, UCM.; VÖLCKER, FA.; BELEI, MB. CIOFFI, LAC.; BERTOLLO, SRP & DERGAM, JA. 2009. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, vol. 75, no. 9, p. 2326-2343.

SCHAEFER, SA. 1991. Phylogenetic analysis of the loricariid subfamily Hypoptopomatinae (Pisces: Siluroidei: Loricariidae), with comments on generic diagnoses and geographic distribution. *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 102, no. 1, p. 1-41.

SCHAEFER, SA. 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on Phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: MALABARBA, LR.; REIS, RE.; VARI, RP.; LUCENA, ZMS & LUCENA, CAS (Eds). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 375-400.

SCHAEFER, SA. 2003. Subfamily Hypoptopomatinae (Armored catfishes). In: REIS, RE.; KULLANDER, SO & FERRARIS, CJ. (Eds.). *Check list of the freshwater fishes of South*

and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 321-329.

SEVERI, W.; EL-DEIR, ACA.; FELIX, RTS.; ARAUJO,IMS.; DA LUZ, SCS.; CALADO NETO, NA.; COSTA, BDF.; JUCÁ-CHAGAS, R. & BARRETTO, MG. 2010. Composição e abundância da ictiofauna na área de influencia dos reservatórios de Pedra e Funil, bacia do Rio de Contas, Bahia. In: MOURA, NA.; ARAÚJO, EL.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, MC.; PIMENTEL, RMM.; ALBUQUERQUE, UP. (Eds.) Reservatórios do Nordeste do Brasil: biodiversidade, ecologia e manejo. Bauru: NUPEEA, p. 541-572.

SEVILLA RG.; DIEZ.; A, NOREN, M.; MOUCHEL, O.; JEROME, M.; VERREZ-BAGNIS, V.; VAN PELT, H.; FAVRE- KREY, L.; KREY, G.; CONSORTIUM, TF. & BAUTISTA, J. 2007. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*, vol. 7, p. 730-734.

SICK, H. 1967. Rios e enchentes na Amazônia como obstáculo para a avifauna. Atlas do Simpósio sobre a Biota Amazônica - Zoologia. Rio de Janeiro: Conselho de Pesquisas sobre o Rio de Janeiro.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E. & ORTÍ, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, vol. 10, p. 407-417.

SLATKIN, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, vol. 236, no. 4803, p.787–792.

SONG, H; BUHAY, JE.; WHITING, MF, & CRANDALL, KA. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, vol. 105, p.13486–13491.

STAMATAKIS, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*, vol. 30, no.9, p. 1312–1313.

STRECKER, U.; FAÚNDEZ, VH. & WILKENS, H. 2004. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 33, no.2, p. 469–481.

TAGLIACOLLO, VA.; ROXO, FF.; DUKE-SYLVESTER, SM.; OLIVEIRA C & ALBERT, JS. 2015. Biogeographical signature of river capture events in Amazonian lowlands. *Journal of Biogeography*, vol. 42, p. no.12, p. 2349–2362.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,

evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, no. 10, p. 2731-2739.

TANG, CQ.; HUMPHREYS, AM.; FONTANETO, D.; BARRACLOUGH, TG & PARADIS, E. 2014. Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data. *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 5, no.10, p. 1086-1094.

TEIXEIRA, ACO.; ALMEIDA, TM.; MOREAU, MS.; MOREAU, ASS. & CORREIO, MNC. 2012. Caracterização física e socioeconômica da bacia hidrográfica do rio Gongogi, Bahia. *Caminhos de Geografia*, vol.13, no. 43. ISSN 1678-6343. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/caminhosdegeografia/article/view/16731/10534>>.

Acesso em 02 de julho de 2017.

THOMAZ, AT.; MALABARBA, LR., BONATTO, SI. & KNOWLES, LL. 2015. 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*, vol. 42, no. 12, p. 2389–2401.

TRINDADE, MEJ.; CETRA, M. & JUCA-CHAGAS, R. 2010. Ictiofauna do Ribeirão Limoeiro, Bacia do Rio Cachoeira, BA. *Biota Neotropica*, Campinas, vol.10, no. 4, p. 111-117.

TURCHETTO-ZOLET, AC.; SEGATTO, ALA.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C. & FREITAS, LB. 2013. Guia prático para estudos filogeográficos. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 105p.

TURNER, TF, MCPHEE, MV, CAMPBELL, P. & WINEMILLER, KO. 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology*, vol. 64, no. 1, p. 186-201.

WARD, RD.; HANNER, R. & HEBERT, PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, vol. 74, n°. 2, p. 329–356.

WEITZMAN, SH.; MENEZES, NA. & WEITZMAN, M.J. 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: Vanzolini, PE & HEYER, WR. Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Brazil. 379–427p.

WRIGHT, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. Vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. Chicago: University of Chicago Press. 590p.

ZANATA, AM. & CAMELIER, P. 2009. *Astyanax vermillion* and *Astyanax burgerai*: new

characid fishes (Ostariophysi: Characiformes) from Northeastern Bahia, Brazil. Neotropical Ichthyology, vol. 7, no. 2, p. 175-184.

ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P. & STAMATAKIS, A. 2013. A General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements. Bioinformatics (Oxford, England), vol. 29, no.22, p. 2869-2876.

ZINK, RM. & BARROWCLOUGH, GF. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. Molecular Ecology, vol. 17, no. 9, p. 2107–2121.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

9. ANEXO 1. Espécies recuperadas pelo método ABGD

23/07/2017

abgd web

Pro
Genética, B

irvação

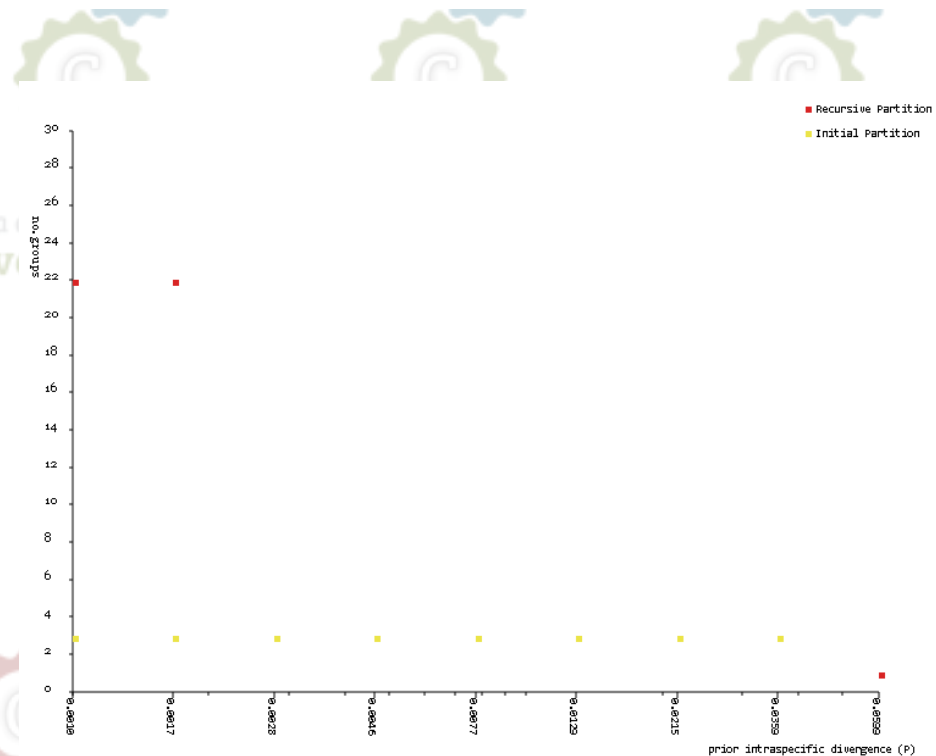
Initial Partition with prior maximal distance $P=7.74e-03$

Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000

Download (left click and save) or see below the tree file corresponding to this partition: click [here](#)

```

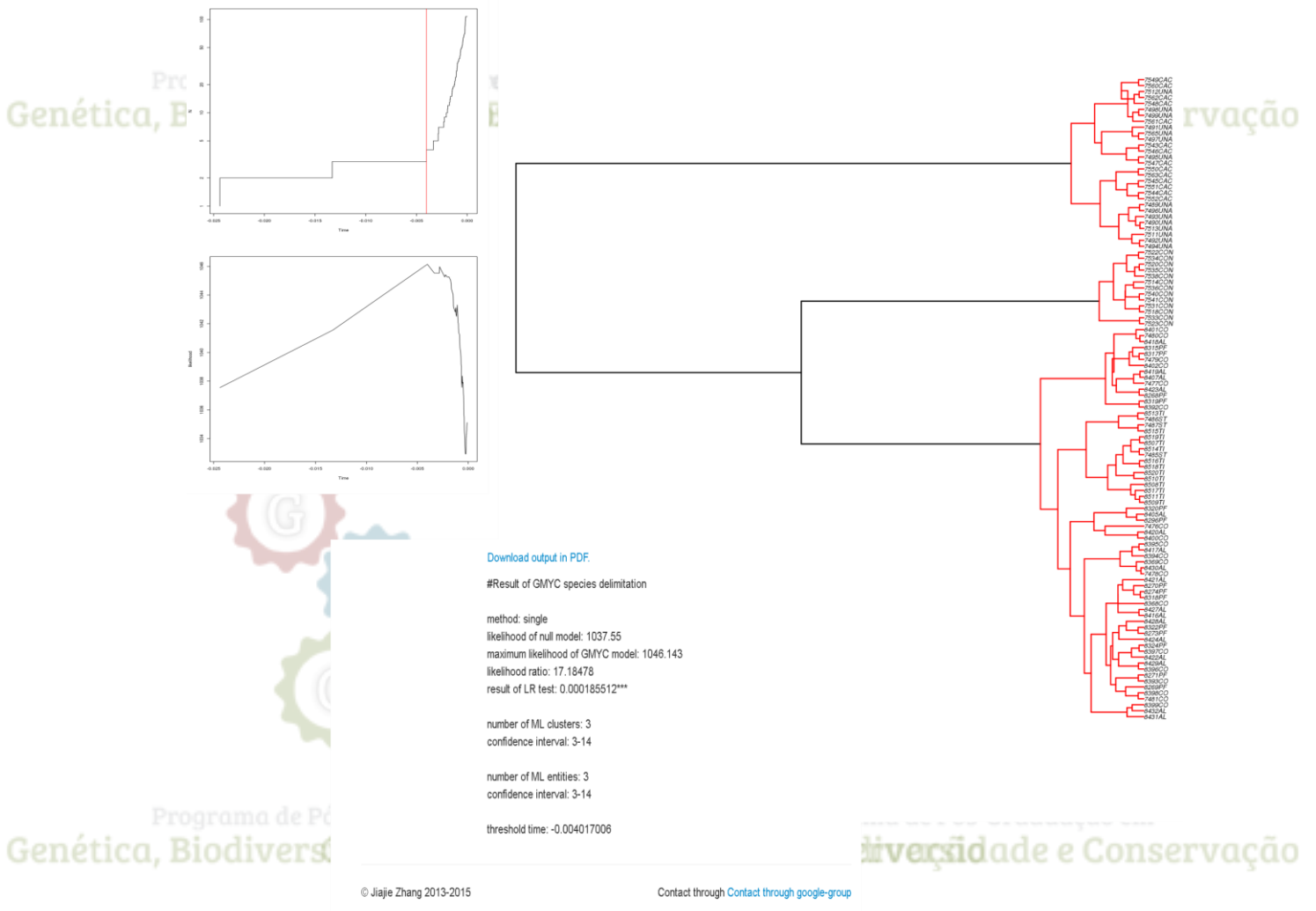
Group[ 1 ] n: 66 ;id: 8405AL 8407AL 8416AL 8417AL 8418AL 8419AL 8420AL 8421AL 8422AL
8423AL 8424AL 8427AL 8428AL 8429AL 8430AL 8431AL 8432AL 7476CO 7477CO 7478CO
7479CO 7480CO 7481CO 8368CO 8369CO 8392CO 8393CO 8394CO 8395CO 8396CO 8397CO 8398CO
8399CO 8400CO 8401CO 8402CO 8268PF 8269PF 8270PF 8271PF 8273PF 8274PF 8296PF 8315PF
8317PF 8318PF 8319PF 8320PF 8322PF 8324PF 7485ST 7486ST 7487ST 8507TI 8508TI 8509TI
8510TI 8511TI 8513TI 8514TI 8515TI 8516TI 8517TI 8518TI 8519TI 8520TI
Group[ 2 ] n: 13 ;id: 7514CON 7518CON 7522CON 7520CON 7523CON 7531CON 7533CON 7534CON
7535CON 7536CON 7538CON 7540CON 7541CON
Group[ 3 ] n: 29 ;id: 7543CAC 7544CAC 7545CAC 7546CAC 7547CAC 7548CAC 7549CAC 7550CAC
7551CAC 7552CAC 7560CAC 7561CAC 7562CAC 7563CAC 7489UNA 7490UNA 7491UNA 7492UNA
7493UNA 7494UNA 7495UNA 7496UNA 7497UNA 7498UNA 7499UNA 7511UNA 7512UNA
7513UNA 7565UNA
    
```



Programa de
Genética, Biodivers

ção em
Conservação

10. ANEXO 2. Espécies recuperadas pelo método GMYC



© Jiajie Zhang 2013-2015

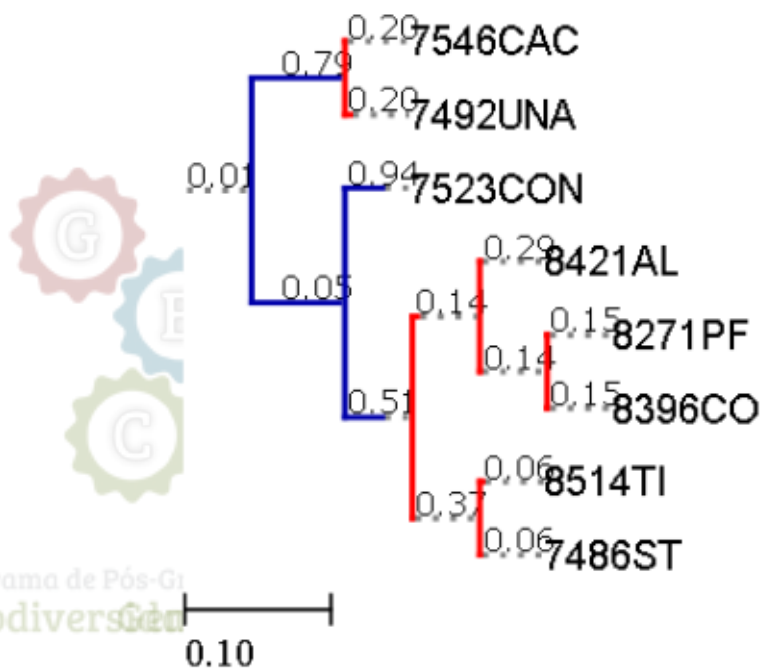
Contact through [Contact through google-group](#)

11. ANEXO 3. Espécies recuperadas pelo método bPTP.

Most supported partition found by simple heuristic search
 Species 1 (support = 0.790)
 7546CAC,7492UNA

Species 2 (support = 0.944)
 7523CON

Species 3 (support = 0.514)
 7486ST,8421AL,8271PF,8396CO,8514TI



12. ANEXO 4. Fotointerpretação do padrão das drenagens das bacias do Contas, Almada, Cachoeira e Una (Norte – Sul, respectivamente). Círculos amarelos destacam anomalias (meandramentos) e círculos vermelhos as curvaturas abruptas (cotovelos).

