

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE  
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

ISADORA JANOLIO DE OLIVEIRA

**Filogeografia de um complexo de espécies de *Phalloceros harpagos* Lucinda,  
2008 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)**

Maringá  
2017

ISADORA JANOLIO DE OLIVEIRA

**Filogeografia de um complexo de espécies de *Phalloceros harpagos* Lucinda,  
2008 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli

Coorientador: Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça

Maringá  
2017

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"  
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

- O48f Oliveira, Isadora Janolio de, 1992-  
Filogeografia de um complexo de espécies de *Phalloceros harpagos* Lucinda, 2008  
(Cyprinodontiformes: Poeciliidae) / Isadora Janolio de Oliveira. -- Maringá, 2017.  
37 f. : il. (algumas color.).
- Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--  
Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2017.  
Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.  
Coorientador: Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça.
1. *Phalloceros harpagos* Lucinda, 2008 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) –  
Biogeografia genética – América do Sul. 2. *Phalloceros harpagos* Lucinda, 2008  
(Cyprinodontiformes: Poeciliidae) – Delimitação de espécies – América do Sul. I.  
Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-  
Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. -597.66713098  
NBR/CIP - 12899 AACR/2

ISADORA JANOLIO DE OLIVEIRA

**Filogeografia de um complexo de espécies de *Phalloceros harpagos* Lucinda,  
2008 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alberto José Prioli  
Universidade Estadual de Maringá

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thais Souto Bignotto  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Valéria de Oliveira  
Universidade Estadual de Maringá

Aprovado em: 03 de julho de 2017.

Local de defesa: Anfiteatro Prof. “Keshiyu Nakatani”, Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho ao meu pai,  
Antônio Fernandes de Oliveira  
Filho “*in memoriam*”.

## AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento especial é destinado ao meu querido pai, que foi a minha inspiração e força em todos os momentos. Agradeço também a minha mãe e ao meu irmão ao apoio emocional e financeiro.

Ao prof. Dr. Alberto José Prioli, pela orientação, pelo incentivo e sugestões durante todas as etapas. Ao meu co-orientador Dr. Weferson Júnio da Graça que foi sempre solícito e participativo. Agradeço também as professoras Sônia Prioli e Alessandra Oliveira pela disponibilidade do local de trabalho.

Aos colegas de laboratório de Biologia Molecular, em especial ao Thomaz Fabrin, que me ajudou imensamente no delineamento e nas análises do meu trabalho.

Aos colegas de laboratório de Macrófitas, em especial ao Douglas Souza, meu parceiro de trabalho e ao Emanuel Silva, meu companheiro e amigo, que esteve ao meu lado em todos os momentos e sem dúvidas foi uma das pessoas mais importantes para a conclusão deste trabalho, me dando apoio emocional e científico.

Aos meus colegas da equipe Lontra (Bárbara Quirino, Matheus Buzo, Laryssa Negri, Raniere Oliveira, Stephane Haracenko, Eloisa Guedes, Jonas Alves, Patrícia Gomes e Larissa Gama) que me incentivaram e me deram apoio nessa jornada científica.

As minhas amigas da graduação, Andressa Barbosa, Ana Paula e Thaís Sanches que sempre estiveram presentes.

As secretárias Aldenir Cruz e Jocemara Celestino, aos bibliotecários Maria Salete e João Hildebrandt e a todos os professores do PEA.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas sugestões para este trabalho.

Ao Nupélia e ao PEA, pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e à CAPES, pela bolsa de mestrado e financiamento do projeto.

## **Filogeografia de um complexo de espécies de *Phalloceros harpagos* Lucinda, 2008 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)**

### **RESUMO**

Espécies são unidades básicas para compreensão de padrões biogeográficos. Portanto, sua delimitação correta é essencial. Um modelo biológico amplamente utilizado para tais estudos são os pecilídeos, devido a sua congruência entre processos de distribuição e diversificação. A distribuição das espécies de *Phalloceros* é geralmente alopátrica e restrita. Por outro lado, *Phalloceros harpagos* apresenta uma distribuição ampla e variações morfológicas entre populações de bacias hidrográficas distintas. Tais características tornam plausível a hipótese de um complexo de espécies. Foram realizadas coletas de *P. harpagos* em suas bacias de ocorrência, que inclui bacias costeiras desde o Espírito Santo até Santa Catarina e a bacia do alto rio Paraná. Posteriormente, extraiu-se o DNA para a amplificação e o sequenciamento parcial do gene mitocondrial COI. A delimitação de espécie foi baseada nos testes de coalescência, ABGD, PTP e GMYC. O relógio molecular foi calculado para inferências filogeográficas. Os resultados indicam que *P. harpagos* corresponde a um complexo de espécies, representado por cinco filogrupos. A diversificação desses grupos provavelmente se iniciou no Mioceno, resultante da separação entre as bacias do rio Paraná e Paraíba do Sul. A maioria dos filogrupos apresentou distribuição restrita, como das bacias costeiras de Santa Catarina, Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo. Porém, um filogrupo apresentou uma distribuição ampla, ocorrendo principalmente nas bacias do rio Paraná, Ribeira de Iguape e Iguaçú. Essa distribuição pode ser decorrente de possíveis eventos de captura de cabeceira, resultantes das reativações de falhas e erosões no quaternário. Hipóteses sobre eventos de vicariância e processos de diversificação em nível de espécie são sugeridas. Informações mais amplas do gênero com datação molecular poderão contribuir de forma significativa, sugerindo eventos de especiação por vicariância e outras inferências gerais para biogeografia da América do Sul.

**Palavras-chave:** PTP. GMYC. Datação molecular. Biogeografia. Vicariância. Cnesterodontini.

## **Phylogeographic of a specie complex within *Phalloceros harpagos* Lucinda, 2008 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)**

### ***ABSTRACT***

Species are basic units for the understanding of biogeographic patterns that is why, its correct delimitation is essential. The group of fishes Poecilian is widely used as biological model, due to its congruence between distribution and diversification processes. In this case, the distribution of the species *Phalloceros* Eigenmann, 1907 is generally allopatric and restricted. On the other hand, *Phalloceros harpagos* presents a wide distribution and morphological variations between populations of different watersheds. Such characteristics make the hypothesis of a complex of cryptic species plausible. Samples of *P. harpagos* were collected in their catch basins, which include coastal basins from Espírito Santo to Santa Catarina and the upper Paraná River basin. Subsequently, the DNA was extracted for amplification and partial sequencing of the Mitochondrial COI gene. Delimitation for research was based in coalescence tests such as ABGD, PTP and GMYC. The molecular clock was calculated for phylogeographic inferences. The results indicated that *P. harpagos* correspond to a complex of species, represented by five phylogroups. The diversification of the groups began in the Miocene, resulting from the separation between Paraná and Paraíba do Sul river basins. Most of the phylogroups had a restricted distribution, such as the coastal basins of Santa Catarina, Rio de Janeiro, Espírito Santo and São Paulo. However, one group presented a wide distribution, occurring mainly in the Paraná, Ribeira de Iguape and Iguaçú river basins. This distribution may be a result of headwater captures events, which happened through a reactivation of failures and erosions in the quaternary. This paper suggests hypotheses about vicariance events and recent diversification processes in species level. Molecular dating information about the genus *Phalloceros* may contribute significantly in the suggestion of vicariance speciation events and other inferences for biogeography in South America.

**Keywords:** PTP. GMYC. Molecular dating. Biogeography. Vicariance. Cnesterodontini.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|          |  |
|----------|--|
| ALPR     | Alto rio Paraná                            |
| ABGD     | <i>Automatic Barcode Gap Discovery</i>     |
| COI      | Citocromo c Oxidase subunidade 1           |
| CBoL     | <i>Consortium for the Barcodes of Life</i> |
| ES       | Espírito Santo                             |
| GMYC     | <i>General Mixed Yule Coalescent</i>       |
| IB       | Inferência bayesiana                       |
| ML       | Máxima verossimilhança                     |
| Ma       | Milhão de ano                              |
| PTP      | <i>Poisson Tree Processes</i>              |
| P. caudi | <i>P. caudimaculatus</i>                   |
| PCRs     | Reações de polimerase em cadeia            |
| RJ       | Rio de Janeiro                             |
| SC       | Santa Catarina                             |
| SP       | São Paulo                                  |
| OTU      | <i>Operational taxonomic unit</i>          |

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: *Molecular phylogenetics and evolution*. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/journals/molecular-phylogenetics-and-evolution/1055-7903/guide-for-authors> >

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                | <b>12</b> |
| 2.1      | COLETA DE DADOS E ESPÉCIMES.....                              | 12        |
| 2.2      | EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA.....                           | 14        |
| 2.3      | DELIMITAÇÃO DE OTUS.....                                      | 15        |
| 2.4      | DATAÇÃO MOLECULAR.....  | 16        |
| <b>3</b> | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>4</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>   | <b>23</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                       | <b>24</b> |
|          | APÊNDICE A – Informações complementares sobre amostragem..... | 30        |
|          | APÊNDICE B – Árvore de máxima verossimilhança.....            | 32        |
|          | APÊNDICE C – Árvore de inferência bayesiana.....              | 33        |
|          | APÊNDICE D – Resultados do ABGD.....                          | 34        |
|          | APÊNDICE E – Árvore de delimitação do PTP.....                | 35        |
|          | APÊNDICE F – Árvore de delimitação do GMYC.....               | 36        |
|          | APÊNDICE G – Distância genética entre haplótipos.....         | 37        |

## 1 INTRODUÇÃO

A delimitação correta das espécies é importante para compreensão da diversidade biológica (Agapow et al., 2004) e sua real distribuição, tornando-se indispensável para inferências sobre padrões macroecológicos e biogeográficos (Blackburn and Gaston, 1998; Brown et al., 1996). Entretanto, a tarefa de delimitação é difícil (Hebert et al., 2003), principalmente quando se refere a espécies que convergem em sua morfologia externa (Derkarabetian et al., 2010; Heideman et al., 2011) ou quando a especiação não é acompanhada por alterações morfológicas (radiação não adaptativa) (Barley et al., 2013). Diversas são as definições sobre o que são espécies, mas de acordo com De Queiroz (2007) espécies são linhagens de metapopulações que evoluem de forma diferente (barreiras de fluxo gênico) e variam em suas características morfológicas e genéticas.

As espécies são consideradas unidades básicas nos estudos biogeográficos (Brown et al., 1996) inferências sobre esses padrões para peixes neotropicais buscam associar a distribuição dos grupos aos processos envolvidos na diversificação no tempo e no espaço (Lundberg, 1998). Diversos trabalhos utilizam peciliídeos como modelos biológicos para inferências de tal natureza (Hrbek et al., 2007; Iturralde-Vinent and MacPhee, 1999; Myers, 1966; Reznick et al., 2017; Rosen, 1975), uma vez que a maioria das espécies desse grupo apresenta distribuição alopátrica (Bussing, 1976; Miller, 1966). Essa característica permite a evolução por vicariância sem caráter adaptativo (Rosen, 1975), o que forma linhagens evolutivas congruentes com a distribuição geográfica e eventos geológicos.

O grupo de peixes de água doce Poeciliidae (Cyprinodontiformes) é bastante diverso, representado por 220 espécies de pequeno porte (Lucinda, 2003), e amplamente distribuído desde a América Central até o norte da Argentina, além de alguns sistemas fluviais da África (Parenti and Rauchenberger, 1989). Dentro desta família, *Phalloceros* Eigenmann, 1907 compreende 22 espécies válidas e amplamente distribuídas ao longo das bacias hidrográficas do sul e sudeste da América do Sul. A maioria das espécies de *Phalloceros* apresenta um padrão geral de distribuição alopátrica e endêmica (Lucinda, 2008). Até 2008, *P. caudimaculatus* era a única espécie válida formalmente descrita. Entretanto, uma revisão taxonômica descreveu 21 novas espécies, com base em padrões de coloração, estrutura do gonopódio, e caracteres merísticos e morfométricos (Lucinda, 2008). Já a diversidade genética e filogeográficas até então são pouco conhecidas.

Ao contrário da maioria das espécies do gênero, *Phalloceros harpagos*, Lucinda 2008, apresenta uma distribuição ampla e simpátrica, ocorrendo nas bacias do rio Paraná-Paraguai e bacias costeiras do Espírito Santo a Santa Catarina e encontrando-se em simpatria com *P. leptokeras*, Lucinda, 2008 e *P. reisi* Lucinda, 2008 na bacia do rio Paraíba do Sul (Lucinda, 2008). Além disso, espécimes de populações distintas de *P. harpagos* possuem variações nos padrões de coloração, no gancho do apêndice gonopodial e algumas proporções corporais. As manchas variam de grandes e escuras a pequenas e estreitas ou ausentes. Existe diferença também em algumas proporções corporais, como na profundidade do corpo e pedúnculo caudal, e também no tamanho dos ganchos dos gonopódios (Lucinda, 2008).

Variações morfológicas, sua ampla distribuição geográfica e sua ocorrência em bacias isoladas, além dos padrões biogeográficos de distribuição restrita para este gênero, tornam plausível a hipótese de um complexo de espécies crípticas sob a denominação *P. harpagos*. Complexo de espécies é o conjunto de duas ou mais espécies que apresentam poucas características morfológicas distinguíveis, tornando trabalhos baseados apenas na taxonomia convencionais inconclusivos (Bickford et al., 2007). Diante disso, estudos utilizando *DNA barcoding* têm sido amplamente utilizados para delimitação e resolução de complexo de espécies (de Carvalho et al., 2011; Lara et al., 2010; Hebert and Gregory, 2005;Pereira et al., 2013, 2011; Valdez-Moreno et al., 2009)

O *DNA barcoding* corresponde ao gene mitocondrial da Subunidade 1 da Citocromo c Oxidase (COI). Esse gene é a principal ferramenta do projeto mundial *Consortium for the Barcodes of Life* (CBoL) para animais, funcionando como um código de barras individual (Hebert et al., 2003). Uma variedade de valores de corte para espécies baseadas em distâncias genéticas para esse gene foram testados e os mais comuns são valores de 1% e 3% em estudos de peixes neotropicais (Lara et al., 2010; Pereira et al., 2013, 2011). Entretanto, métodos para delimitação de espécie usando apenas regra de corte porcentual têm uma fraca relação com as teorias de evolução e variação genética (Barracough et al., 2009; Kapli et al., 2017). Apesar disso, atualmente estão disponíveis análises que levam em conta teoria evolutivas, como o *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (Puillandre et al., 2012), *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC) (Fujisawa and Barracough, 2013; Pons et al., 2006) e o *Poisson Tree Processes* (PTP) (Zhang et al., 2013). As duas últimas abordagens combinam a teoria de coalescência com modelos de diversificação e estipulam limites para delimitar linhagens que evoluem independentemente (*Operational Taxonomic Unit* - OTUs (Floyd et al., 2002)).

No caso de *P. harpagos* a delimitação correta das espécies faz-se necessário para inferências biogeográficas. Nesse caso, como se trata de uma ou mais espécies próximas, conceituamos como padrões filogeográficos (Avise, 2000). Com dados de taxas de substituição para um gene ao longo do tempo, os dados de distância genética podem ser comparados com datas de eventos geológicos conhecidos, e resultar em tempos de diversificação e eventos vicariantes (Alda et al., 2013; Bermingham et al., 1997; Bermingham and Avise, 1986; Sivasundar et al., 2001). Portanto, este trabalho teve como objetivo (1) testar a hipótese que há um complexo de espécies sob a denominação *Phalloceros harpagos* usando COI; (2) inferir os momentos de diversificação e os principais processos e eventos que moldaram a distribuição geral das espécies ou linhagens do que é considerado *Phalloceros harpagos*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA DE DADOS E ESPÉCIMES

A distribuição atual de *P. harpagos* corresponde às bacias do alto e médio rio Paraná e na bacia do baixo rio Paraguai, além de drenagens costeiras desde o rio Itabapoana (Espírito Santo) até o rio Araranguá (Santa Catarina) (Lucinda, 2008). Foram amostrados indivíduos de *P. harpagos* das principais bacias e sub-bacias de ocorrência da espécie (exceto na bacia do rio Paraguai), através de expedições de campo e bancos de espécimes fornecidos por bancos mantidos por museus. Além disso, algumas sequências de DNA foram obtidas em banco de dados (Genbank). No total, foram analisados 85 indivíduos de *P. harpagos* de 46 localidades (Fig. 1, Apêndice A) e sua identificação morfológica consistiu principalmente na presença do gancho gonopodial.

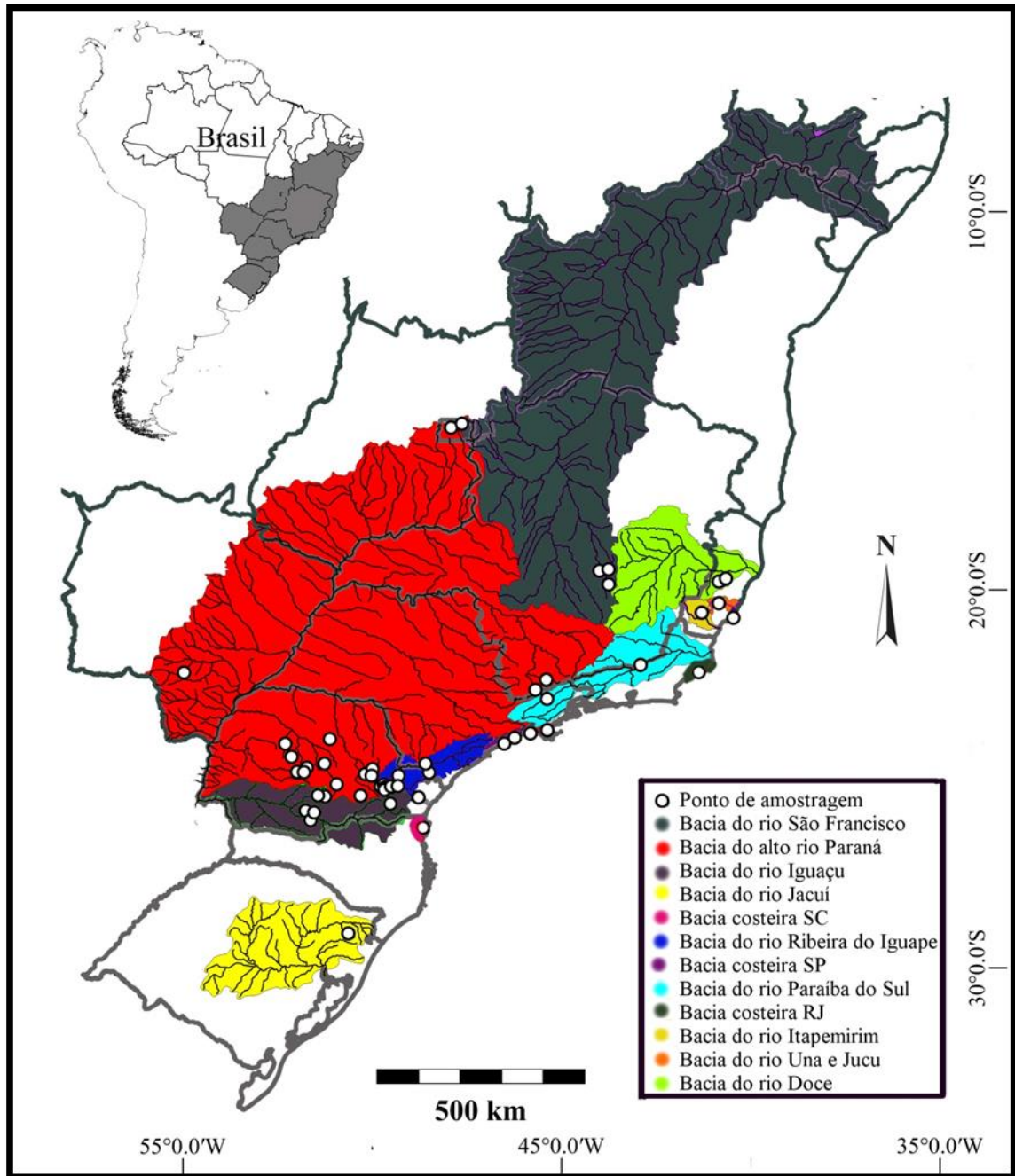


Figura 1. Mapa de amostragem de *Phalloceros*

Amostras de tecidos musculares da bacia costeira do Espírito Santo (bacia do rio Una, rio Jucu e rio Itapemirim), São Paulo (bacia do rio Caraguatatuba e Cubatão), Santa Catarina (São Francisco do Sul) e alguns indivíduos da bacia costeira do Paraná e do alto rio Paraná foram concedidos pelo Museu de Ciências e Tecnologia - PUCRS e Museu de Biologia Professor Mello Leitão. Demais exemplares identificados morfológicamente como *P. harpagos* foram coletados com pesca elétrica ou peneiras nas bacias do rio Paraná, do rio Iguaçu, do Ribeira de Iguape, do rio Paraíba do Sul (localidade tipo) e costeira do Rio de Janeiro.

Os procedimentos após as coletas seguiram as normas da resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Os exemplares foram anestesiados com benzocaína 10% e fixados em álcool 70% e depositados na coleção ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da UEM. As amostragens foram realizadas com parecer favorável (002/2012) do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM e com a licença permanente para coleta e transporte de material biológico SISBIO, processo no. 14028-1 de 10 de dezembro de 2008, ambos concedidos a Weferson J. da Graça.

A amostragem também incluiu representantes de outras espécies de *Phalloceros* obtidos através de museu ou banco de dados (Genbank) (Fig. 1, Apêndice A). As espécies amostradas foram *P. elachistos* Lucinda, 2008 (n=7, coletados na bacia do rio Doce - Espírito Santo), *P. uai* Lucinda, 2008 (n=8, coletadas na bacia do São Francisco), *P. caudimaculatus*, Hensel, 1868 (n=2, coletadas na bacia do rio Jacuí). A espécie *Poecilia reticulata*, Peters, 1859 foi utilizada como *outgroup*.

## 2.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído de tecidos musculares dos espécimes com kits comerciais das marcas Promega e Invitrogen, conforme instruções dos fabricantes. O DNA foi quantificado utilizando-se gel de agarose por comparação com DNA do fago  $\lambda$  de concentração conhecida. Para as amplificações do DNA por meio de reações de polimerase em cadeia (PCRs) foi selecionado o gene mitocondrial COI, com seguinte par de *primers*: H7152 (5' CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA3') e L6448-F1 (5'TCAACCAACCACAAAG ACATTTCGGCAC 3') (Ivanova et al., 2007).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador MJ Research PTC100. As condições para reação seguiram o proposto por Inova et al. (2007). Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1% por comparação com tamanhos conhecidos de DNA ladder 100 pb (Invitrogen). Para purificação dos amplicons foi utilizado polietilenoglicol (PEG) 8000 20% (m/v), seguindo o protocolo proposto por Rosenthal et al. (1993). As reações amplificadas foram sequenciadas em plataforma ABI 3500, seguindo instruções do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), parte da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).



### 2.3 DELIMITAÇÃO DE OTUS

As sequências amplificadas foram editadas manualmente no programa BioEdit (Hall, 1999) e alinhadas com o algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994) disponível no programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013). Após a edição das sequências foram obtidos haplótipos únicos no programa DNAsp 5.0 (Librado and Rozas, 2009) para as análises de delimitação. As três abordagens utilizadas para delimitação de OTU foram: ABGD, PTP e GMYC. A utilização de mais de um teste para a delimitação é recomendado (Carstens et al., 2013). Os dois últimos métodos, ao contrário do ABGD, necessitam da entrada de uma árvore filogenética para ajustarem os processos de especiação e de coalescência (Tang et al., 2014). As árvores de entrada foram criadas a partir dos haplótipos únicos, por meio dos métodos estatísticos de máxima verossimilhança (ML) (Stamatakis, 2006) e inferência bayesiana (IB) (Huelsenbeck, 2001).

O método de ABGD atua na identificação de clusters de sequências de possíveis espécies, com base em pares de distâncias genéticas e nas diferenças entre as variações intra e interespecíficas (*barcoding gap*) (Puillandre et al., 2012). O teste está disponível no endereço <http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html> e foi realizado seguindo as configurações padrões propostas, como recomendado por Puillandre et al. (2012) utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2P (K2P).

A análise de máxima verossimilhança foi realizada no programa raxmlGUI (Silvestro and Michalak, 2012), utilizando o algoritmo *rapid bootstrap* e a função autoMRE para reamostragens, utilizando o modelo de substituição GTR +  $\Gamma$  determinado pelo programa PartitionFinder (Lanfear et al., 2012). Essa árvore enraizada foi utilizada para o teste PTP (disponível em site <http://species.h-its.org/ptp/>). Essa análise calcula o momento de transição entre eventos de especiações (entre espécies) e eventos de ramificação (dentro de espécies) em termos de número de substituições para a determinação de OTUs (Zhang et al., 2013).

A árvore ultramétrica construída a partir do método estatístico de inferência bayesiana foi feita no programa BEAST (Drummond et al., 2006), com cadeias MCMC por 10 milhões de gerações, amostrando árvores a cada 1000 gerações, com relógio molecular estrito estimado utilizando a taxa de substituição linhagem específica de 0,006% por milhão de anos (Bermingham et al., 1997). O modelo de especiação utilizado *a priori* foi o de coalescência com tamanho constante, usando o modelo de substituição TN93 com todas as frequências de substituição das bases nitrogenadas iguais, escolhido pelo PartitionFinder. Para verificar a

convergência das cadeias e o *effective sampling size* (ESS>200) foi utilizado o Tracer v.1.5 (Drummond and Rambaut, 2007). A árvore resultante foi utilizada pelo teste GMYC, que identifica o ponto de transição entre o processo de especiação (Yule, 1925) e coalescência (Hudson, 1990) e identifica *clusters* de haplótipos. Cada *cluster* significativo representa uma possível OTU (Pons et al., 2006; Fujisawa and Barraclough, 2013). A identificação dos *clusters* significativos foi realizada no *software* R (R Team, 2008) utilizando o pacote *splits* (Ezard, 2009). Após isso, foram calculadas distâncias dentro e entre as principais linhagens definidas pelos testes de delimitação, utilizando o modelo de substituição K2P no Mega 6.0.

## 2.4 DATAÇÃO MOLECULAR

Com intuito de obter dados de tempo de divergência e inferir os principais processos e eventos que moldaram a distribuição das espécies de *Phalloceros*, foi construída uma árvore filogenética enraizada com o pressuposto de relógio molecular calibrado, que admite que a taxa de mutação não se altera ao longo do tempo. O relógio molecular calibrado assumido para esses organismos atribui ao gene COI a taxa de mutação não corrigida de 1,2% por milhão de anos (Ma) para o gene utilizado. Essa é uma taxa média de mutação, uma vez que dados geológicos e fósseis evidenciam taxa de mutação em peixes variando de 1,1 a 1.3% Ma (Bermingham et al, 1997; Near et al., 2003). Para construção dessa árvore foi utilizado o mesmo procedimento de criação da árvore de entrada do GMYC, o único diferencial é que esta é enraizada.

## 3 RESULTADOS

Foram obtidas 103 sequências de COI (554 pares de base), das espécies *P. harpagos* (n = 85), *P. uai* (n = 8), *P. elachistos* (n = 7), *P. caudimaculatus* (n = 2) e *P. reticulata* (n=1, *outgroup*). As sequências apresentaram 162 sítios variáveis, dos quais 108 foram informativos, constituindo um total de 22 haplótipos únicos. Para a delimitação das OTUs foram obtidas árvores de máxima verossimilhança (Apêndice B) e inferência bayesiana (Apêndice C), que apresentaram na maioria de seus ramos altos valores de suporte, tanto de *bootstrap* quanto de probabilidade *a posteriori*, respectivamente.

As árvores obtidas foram utilizadas para a delimitação de OTUs pelos métodos PTP e GMYC. Os resultados das análises ABGD (Apêndice D) PTP (Apêndice E) e GMYC (Apêndice F) são representados na Figura 2, juntamente com o tempo de divergência

estimado entre as linhagens/espécies. Cada OTU definida pelo GMYC representou um filogruppo que teve sua denominação relacionada com o estado de amostragem, bacia hidrográfica principal a qual pertence, ou ainda, pelo nome da espécie ou sua abreviação.

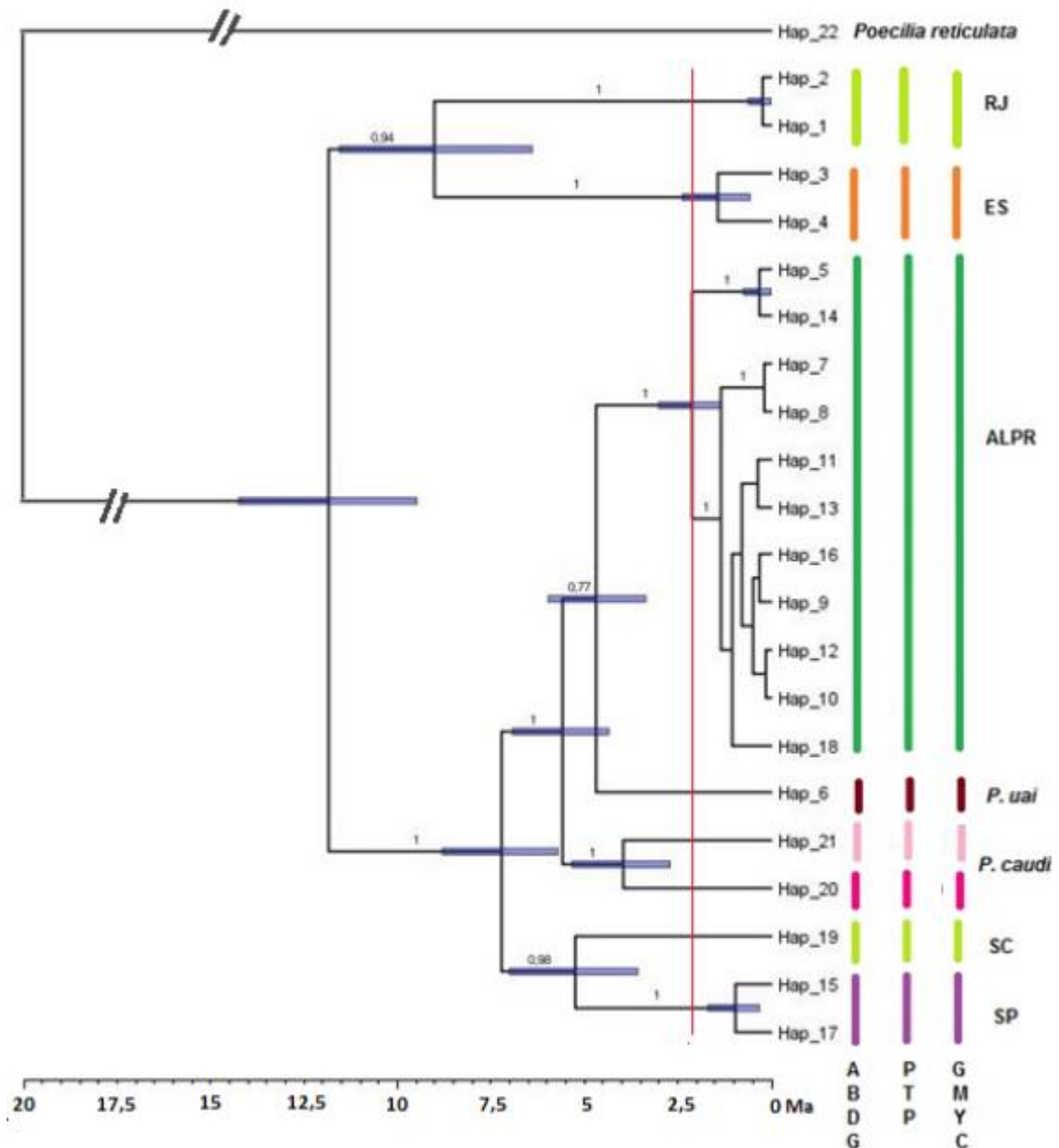


Figura 2. Árvore de inferência bayesiana enraizada calibrada com relógio molecular estrito resultante de seqüências parciais do gene COI. Valores acima dos ramos indicam a probabilidade *a posteriori*; as barras azuis indicam intervalo de tempo das ramificações; barra vermelha corresponde ao limiar de tempo encontrado pelo GMYC, barras coloridas indicam as OTUs delimitadas pelos testes ABGD, PTP e GMYC, respectivamente.

No total foram obtidas oito OTUs (filogrupos) pelos testes ABGD, PTP e GMYC. Todos os métodos apontam cinco OTUs para a espécie identificada morfologicamente como

*P. harpagos*, com distâncias genéticas superiores a 5% (Tabela 1). Indivíduos de *P. elachistos* (hap\_4) se agruparam com *P. harpagos* das bacias litorâneas do Espírito Santo (hap\_3 e hap\_4). Os outros dois OTUs corresponderam a *P. uai* (hap\_6) e a *P. caudimaculatus* (hap\_20 e hap\_21). Os correspondentes dos haplótipos, filogrupos e localização geográfica se encontram no apêndice A.

Tabela 1. Distância genética KP2 interespecífica (coluna abaixo da diagonal) e intraespecífica (linha na diagonal) dos filogrupos de *Phalloceros* identificados pelos teste de delimitação.

|                 | RJ           | ES           | PR           | SP           | SC        | <i>P. uai</i> | <i>P. caudi</i> |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------|---------------|-----------------|
| RJ              | <b>0.002</b> |              |              |              |           |               |                 |
| ES              | 0.091        | <b>0.015</b> |              |              |           |               |                 |
| PR              | 0.107        | 0.095        | <b>0.013</b> |              |           |               |                 |
| SP              | 0.133        | 0.105        | 0.073        | <b>0.011</b> |           |               |                 |
| SC              | 0.124        | 0.102        | 0.070        | 0.055        | <b>NC</b> |               |                 |
| <i>P. uai</i>   | 0.107        | 0.095        | 0.053        | 0.070        | 0.071     | <b>NC</b>     |                 |
| <i>P. caudi</i> | 0.123        | 0.106        | 0.060        | 0.073        | 0.075     | 0.064         | <b>0.051</b>    |

Obs.: (NC) = Não foi possível calcular.

As análises filogenéticas separaram em dois grandes grupos as espécies de *Phalloceros*. O primeiro grupo é representado pelos indivíduos localizados nas bacias costeiras do Rio de Janeiro e Espírito Santo e o segundo, formado por *P. caudimaculatus*, *P. uai* e *P. harpagos* (filogrupos do ALPR, SP e SC). Essa primeira diversificação se iniciou há 14 Ma e o limiar de tempo encontrado pelo GMYC foi de 2,12 Ma (Fig. 2). Os haplótipos (1 e 2) das bacias pertencentes ao estado do Rio de Janeiro (localidade tipo – bacia do Paraíba do Sul e bacia litorânea) representam um único filogrupo *P. harpagos*, que divergem das outras localidades com distância genética entre 9 e 13 % (Tabela 1). Os haplótipos da bacia do Espírito Santo (bacia do rio Doce, rio Una, rio Jucu e rio Itapemirim) incluem tanto indivíduos identificados como *P. harpagos* como *P. elachistos* (Filogrupo ES), que divergem dos outros grupos entre 9 e 10% (Tabela 1).

O grupo que inclui principalmente representantes da bacia do alto rio Paraná (ALPR), é representado também por espécimes da bacia do Iguçu, Ribeira de Iguape, bacia costeira do Paraná, compartilhando o mesmo haplótipo (hap\_5). Além disso, esse filogrupo apresenta outros dois integrantes, um da bacia costeira de São Paulo (hap\_16) e outro do Paraíba do Sul (hap\_18). O hap\_18 (localizado no Estado de São Paulo) apresenta uma distância de apenas 0,7% em relação ao hap\_9 (bacia do rio Sapucaí em São Paulo - alto rio Paraná), enquanto sua distância com os outros haplótipos da sua própria bacia é mais de 10% (Apêndice G). O filogrupo ALPR possui uma divergência média de 5,6% em relação as outras espécies de *Phalloceros* e 7% dos outros grupos identificados morfológicamente como *P. harpagos* da

bacia do litoral de São Paulo (filogrupo SP) e Santa Catarina (filogrupo SC), que divergem entre si em 5,5%.

#### 4 DISCUSSÃO

Todos os métodos de delimitação apontaram a presença de cinco filogrupos para espécimes identificados morfologicamente como *P. harpagos*, com uma distância entre os grupos de no mínimo 5%, indicando que se trata de um complexo de espécies. Essa distância é considerada alta e demonstra a possibilidade de espécies diferentes, tendo em vista que o limite de corte proposto por Hebert et al. (2003) admite o valor de 3% como um limiar suficiente para separação de duas espécies. Diversos trabalhos com peixes neotropicais indicam que as distâncias intraespecíficas médias não ultrapassam 1% (Gomes et al., 2015; Lara et al 2010; Pereira et al., 2013, 2011; Rosso et al., 2012). De acordo com os resultados obtidos há um aumento de número de espécies descritas de *Phalloceros* nas áreas estudadas, sendo que apenas o grupo das bacias costeiras do Rio de Janeiro, que inclui a localidade tipo (bacia do rio Paraíba do Sul), corresponde a *P. harpagos*. O grupo de espécimes analisados referentes as bacias do Espírito Santo pertencem a *P. elachistos*. Enquanto que os filogrupos SP, SC e ALPR possivelmente representam outras espécies de *Phalloceros*. Diante disso, esse grupo necessita de uma abordagem taxonômica integrativa, incorporando análises moleculares, morfológicas e ecológicas (Fujita et al., 2012).

Outros indícios apoiam essa hipótese de complexo de espécies, como o padrão de distribuição ampla para *P. harpagos*, que diverge das outras espécies do gênero e a presença de variações morfológicas nos padrões de coloração e nos gonopódios (Lucinda, 2008). Na identificação de pecilídeos, apenas caracteres morfológicos não conseguem, muitas vezes, resolver de forma eficaz relacionamentos abaixo do nível de gênero (Bagley et al., 2015; Schultz and Miller, 1971). A principal forma de identificação morfológica em nível de espécie para esse gênero é através das características dos gonopódios (Lucinda, 2008), que correspondem a uma característica homoplástica não confiável, pois muitas vezes são resultantes de uma evolução convergente (Hankison and Morris, 2003; Langerhans et al., 2005). Além disso, esses caracteres não estabelecem uma boa relação filogenética (Doadrio et al., 2009; Perdices et al., 2005, 2002). Portanto, métodos não convencionais, como dados baseados em coalescência podem auxiliar na delimitação de espécies (Bagley et al., 2015; Barley et al., 2013; Niemiller et al., 2012).

Nossas estimativas de tempo de divergência indicaram o final do Mioceno médio (11 e 14 Ma) para a primeira diversificação (Fig. 2). Contudo, a ramificação de *Phalloceros* se iniciou em torno de 42 Ma indicando a existência de outras espécies mais antigas não amostradas ou extintas (Reznick et al., 2017). Essa primeira diversificação evidenciada em nosso estudo causou ramificação entre as duas principais linhagens mitocondriais, que separou os filogrupos RJ e ES dos outros grupos de *Phalloceros* analisados. Dentro de cada uma dessas principais linhagens, os mais importantes eventos de radiação que levaram ao surgimento das OTUs atuais ocorreram durante o final do Mioceno e início do Plioceno (5 e 9 Ma). Finalmente, dentro da OTU ou da população, o limiar de tempo do GMYC, indicou especiações em torno de 1,2 Ma, demonstrando que a origem dessas espécies está relacionada a eventos recentes.

A primeira diversificação provavelmente está associada à separação das bacias do Paraná e Paraíba do Sul que ocorreu no período do Mioceno médio (11,8 – 20 Ma) (Lundberg et al., 1998), resultante do soerguimento da “estrutura Arujá” (Riccomini, 1989). Evidências geológicas, paleontológicas e de relações filogenéticas em níveis de famílias e gêneros que apoiam a existência de uma conexão passada entre essas bacias (Ab'saber, 1957; Lundberg et al., 1998; Malabarba, 1998, Ribeiro, 2006; Riccomini, 1989, Riccomini, 2004). Juntamente com essas informações os resultados obtidos neste estudo respaldam a hipótese de compartilhamento de fauna entre essas bacias, devido à presença de um ancestral comum nesse mesmo período geológico (Mioceno médio). Além disso, a separação dessas duas bacias apoia a interpretação de que *P. harpagos* da bacia do Paraíba do Sul possivelmente representa uma espécie diferente daquela encontrada na bacia do rio Paraná, decorrente de uma especiação por vicariância.

Atualmente a Serra da Mantiqueira é uma barreira eficaz no isolamento dessas duas bacias, já que suas composições ictiológicas apresentam uma baixa similaridade (Ingenito and Buckup, 2007). Diante disto, o fato de um único indivíduo (hap\_18) do rio Paraíba do Sul pertencer ao grupo ALPR torna a introdução antrópica uma possível explicação para tal situação. Uma elucidação viável e contrária seria por eventos de captura de cabeceira recentes que resultaria no compartilhamento de fauna, como relatado por outras espécies de peixes (Serra et al., 2007), como por exemplo, *Phallotorynus fasciolatus* Henn, 1916 (Henrique et al., 2005). Informações geomorfológicas de falhas no quaternário na bacia rio Sapucaí Mirim - alto rio Paraná (localização do hap\_9), poderiam ter causado reativações tectônicas no quaternário (Takashi et al., 2001), resultando em eventos de captura de cabeceiras, que por

sua vez, provocaria o compartilhamento recente (<1 Ma) do ancestral comum do hap\_9 e hap\_18.

Além desse possível compartilhamento recente de fauna ictiológica, a bacia do rio Paraná apresenta outras comunicações, mesmo que separado por diversas elevações de bacias costeiras (Buckup, 2011) ou então, por rupturas, como das Cataratas, que isolou o alto rio Paraná do rio Iguaçu há aproximadamente 20 Ma (Maack, 1981). Mesmo com essas barreiras geológicas evidentes, os espécimes do ALPR possivelmente correspondem à mesma espécie, pois todos os testes de delimitação indicam o mesmo resultado. Além disso, esse grupo apresenta o mesmo padrão de coloração e manchas, com pequenas divergências para as populações da bacia do rio Paraná (Lucinda, 2008).

A presença do hap\_5 nas bacias do rio Paraná, Ribeira de Iguape, Iguaçu e costeira do Paraná indicam dispersão por eventos de compartilhamento recentes. A taxa de substituição nucleotídica assumida de 1,2% por Ma (Bermingham et al, 1997) para o gene COI, implicaria em uma substituição a cada 150.000 anos, em média. Portanto, a distribuição do haplótipo 5 por três bacias, isoladas por soerguimentos muito antigos, evidencia que atividades geológicas próximas às cabeceiras em divisores de águas têm ocorrido em tempos relativamente recentes e propiciado a dispersão do hap\_5. Provavelmente, esses eventos ocorreram em um período muito aquém dos 150.000 anos que seriam esperados para a divergência haplotípica em um nucleotídeo.

Diversos trabalhos demonstram o compartilhamento de comunidades de peixes entre essas bacias (Ribeiro, 2006). Como por exemplo, *Trichomycterus davisi* Haseman, 1911 e *Rhamdiopsis moreirai*, Haseman, 1911 presentes no rio Iguaçu e Ribeira de Iguape (Ingenito et al., 2004) e *Hypostomus ancistroides* Iheringi, 1911 presentes no rio Iguaçu, Ribeira de Iguape e Paranapanema (Takako et al., 2005). À vista disso, a explicação mais plausível para o compartilhamento desta OTU entre essas bacias seriam eventos de capturas de cabeceiras, decorrentes de erosão e reativações de fendas (Ribeiro, 2006), no quaternário (Riccomini and Assumpção, 1999). A ativação mais recente relatada, especialmente nos rios Ribeira de Iguape, Iguaçu, Paranapanema e Tietê, é de aproximadamente 1,6 Ma (Saadi et al., 2002), congruente com a formação desse filogruppo que surgiu em torno de 1,3-2,2Ma. Essa ativação também foi evidenciada na bacia Ribeira de Iguape, que por ser uma bacia tafrogênicas (bacias oriundas de falhas resultantes de movimentos verticais entre os blocos) (Riccomini et al., 2004) são mais susceptíveis à erosão e capturas de cabeceiras (Ribeiro, 2006). A presença do hap\_5 em todas essas bacias indica que essas reativações ainda são corriqueiras nessa

região. Vários fatores apoiam, portanto, a hipótese de compartilhamento por capturas de cabeceiras nessas áreas, o que está em concordância com a constatação do sudeste do Brasil ser uma área tectonicamente ativa e propensa a sofrer deformações como proposto por Cobbold et al. (2001).

Além do mais, essas bacias se encontram no Arco de Ponta Grossa, que se formaram a partir de soerguimento do embasamento cristalino da região sudeste da bacia do Paraná (Petri and Fulfaro, 1983). Esse arco apresenta sistemas de falhas e fraturas profundas (Raposo, 1995), e sua ativação durante o cenozóico (Almeida and Carneiro, 1998), provavelmente resultou no intercâmbio de fauna entre os sistemas de drenagens adjacentes (Ribeiro, 2006). Outro exemplo, que pode ser resultante de eventos de cabeceira é o hap<sub>16</sub> da bacia costeira de São Paulo, já que outras bacias presentes nesse Estado, como a bacia alto rio Guaratuba apresentam uma alta similaridade na composição de peixes com o rio Tietê, decorrentes também de reativação de falhas quaternárias (Ribeiro et al., 2006) ou então de processos erosivos (Oliveira, 2003).

De acordo com as discussões apresentadas acima, a ampla distribuição do ALPR está associada ao padrão C definido por Ribeiro (2006), no qual assume eventos de intercâmbios recentes entre os rios de escudos cristalinos de montanha e rios adjacentes. Por outro lado, os filogrupos das bacias costeiras do Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina apresentam padrões típicos apresentados por outros *Phalloceros*, com distribuição restrita e isolada (Lucinda, 2008). Esse padrão filogeográfico, provavelmente, é resultante de eventos de vicariância, devido à evolução geológica das cadeias de altas montanhas associada aos ambientes costeiros que proporcionam uma oportunidade de vicariância e isolamento dessas espécies (Buckup, 2011). De modo geral, drenagens costeiras, apresentam alta taxa de endemismo e apresentam grande significado biogeográfico (Ribeiro, 2006). Tais características geológicas complexas tornam a região neotropical altamente interessante e valiosa para estudos relacionados a distribuição de espécies (Vari and Malabarba, 1998).

Diante disso, este estudo ressalta a necessidade de uma revisão integrativa (dados moleculares e taxonômicos) para inferências filogenéticas e filogeográficas de todas as espécies do gênero, para uma compreensão da real distribuição e eventos envolvidos em sua diversificação. Padrões filogeográficos mais confiáveis dependem de uma identificação correta das espécies, já que alguns padrões, como a vicariância, são resultantes de eventos mais antigos, evidenciados apenas em nível de gêneros ou família, enquanto, eventos recentes



como de compartilhamento por eventos de cabeceira são respaldados por diversificação recente, em nível de espécie (Buckup, 2011).

## 5 CONCLUSÃO

Por meio desse estudo houve o aumento da diversidade biológica e direcionamento para uma revisão taxonômica integrativa do complexo de espécies *P. harpagos* e o entendimento inicial de padrões filogeográficos para o gênero. Diversas hipóteses foram sugeridas e podem servir de suporte para futuros trabalhos, tais como a conexão passada entre as bacias do rio Paraíba do Sul e rio Paraná, no qual sua separação resultaria em processos de especiação por vicariância e eventos de captura de cabeceira recentes em escudos cristalinos e rios adjacentes. A maioria dos *Phalloceros* analisados apresenta distribuição restrita, principalmente quando se trata de bacias costeiras, corroborando informações desse gênero. Entretanto, o grupo ALPR apresenta uma distribuição ampla, decorrente de eventos de cabeceiras recentes. Provavelmente, estudos com esse gênero com datação molecular poderão resultar em informações relevantes para biogeografia da América do Sul, devido a sua ampla distribuição e sua congruência entre eventos geológicos e de diversificação.

## REFERÊNCIAS

- Ab'Saber, A.N., 1957. O problema das conexões antigas e da separação da drenagem do Paraíba e Tietê. *Boletim Paulista de Geografia*, 26: 38–49.
- Agapow, P., Bininda-Emonds, O.R.P., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C., Purvis, A., 2004. The Impact of Species Concept on Biodiversity Studies. *Q. Rev. Biol.* 79, 161–179. doi:10.1086/383542
- Alda, F., Reina, R.G., Doadrio, I., Bermingham, E., 2013. Phylogeny and biogeography of the *Poecilia sphenops* species complex (Actinopterygii, Poeciliidae) in Central America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 1011–1026. doi:10.1016/j.ympev.2012.12.012
- Almeida, F.F.M., Carneiro, C.D.R., 1998. Origem e evolução da serra do mar. *Rev. Bras. Geociencias* 28, 135–150.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA
- Bagley, J.C., Alda, F., Breitman, M.F., Bermingham, E., Van Den Berghe, E.P., Johnson, J.B., 2015. Assessing species boundaries using Multilocus species delimitation in a morphologically conserved group of Neotropical freshwater fishes, the *Poecilia sphenops* species complex (Poeciliidae). *PLoS One* 10, 1–31. doi:10.1371/journal.pone.0121139
- Barley, A.J., White, J., Diesmos, A.C., Brown, R.M., 2013. The challenge of species delimitation at the extremes: Diversification without morphological change in philippine sun skinks. *Evolution (N. Y.)*. 67, 3556–3572. doi:10.1111/evo.12219
- Barracough, T.G., Hughes, M., Ashford-Hodges, N., Fujisawa, T., 2009. Inferring evolutionarily significant units of bacterial diversity from broad environmental surveys of single-locus data. *Biol. Lett.* 5, 425–428. doi:10.1098/rsbl.2009.0091
- Bermingham, E., Avise, J.C., 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics* 113, 939–965.
- Bermingham, E., Mccafferty, S.S., Martin, A.P., 1997. Fish Biogeography and Molecular Clocks: Perspectives from the Panamanian Isthmus. *Mol. Syst. Fishes*. doi:10.1016/B978-012417540-2/50009-9
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22, 148–155. doi:10.1016/j.tree.2006.11.004
- Blackburn, T.M., Gaston, K.J., 1998. Some Methodological Issues in Macroecology. *Am. Nat.* 151, 68–83. doi:doi:10.1086/286103
- Brown, J.H., Stevens, G.C., Kaufman, D.M., 1996. The geographic range: Size, Shape, Boundaries, and Internal Structure. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 597–623. doi:10.1146/annurev.ecolsys.27.1.597
- Buckp, P.A., 2011. The Eastern Brazilian Shield. *Hist. Biogeogr. Neotrop. Freshw. Fishes* 203–210.
- Bussing, W. a, 1976. Geographic Distribution of the San Juan Ichthyofauna of Central America with Remarks on its Origin and Ecology. *Biol. Sci.* 156–175.
- Carstens, B.C., Pelletier, T.A., Reid, N.M., Satler, J.D., 2013. How to fail at species delimitation. *Mol. Ecol.* 22, 4369–4383. doi:10.1111/mec.12413
- Cobbold, P.R., Meisling, K.E., Mount, V.S., 2001. Reactivation of an obliquely rifted margin, Campos and Santos basins, southeastern Brazil. *Am. Assoc. Pet. Geol. Bull.* 85, 1925–1944. doi:10.1306/8626D0B3-173B-11D7-8645000102C1865D
- de Carvalho, D.C., Oliveira, D.A.A., Pompeu, P.S., Leal, C.G., Oliveira, C., Hanner, R., 2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA* 22, 80–86.

- doi:10.3109/19401736.2011.588214
- De Queiroz, K., 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Syst. Biol.* 56, 879–886. doi:10.1080/10635150701701083
- Derkarabetian, S., Steinmann, D.B., Hedin, M., 2010. Repeated and time-correlated morphological convergence in cave-dwelling harvestmen (Opiliones, Laniatores) from montane Western North America. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0010388
- Doadrio, I., Perea, S., Alcaraz, L., Hernandez, N., 2009. Molecular phylogeny and biogeography of the Cuban genus *Girardinus* Poey, 1854 and relationships within the tribe Girardinini (Actinopterygii, Poeciliidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 50, 16–30. doi:10.1016/j.ympev.2008.09.014
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 4, 699–710. doi:10.1371/journal.pbio.0040088
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214. doi:10.1186/1471-2148-7-214
- Ezard, T., Fujisawa, T., Barraclough, T.G., 2009. SPLITS: SPecies' LImits by Threshold Statistics. R package version 1.0-18/r45. Available from: URL <http://R-Forge.R-project.org/projects/splits/>, last accessed June 2017
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., Blaxter, M., 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol. Ecol.* 11, 839–850. doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01485.x
- Fontaneto, D., Flot, J.F., Tang, C.Q., 2015. Guidelines for DNA taxonomy, with a focus on the meiofauna. *Mar. Biodivers.* 45, 433–451. doi:10.1007/s12526-015-0319-7
- Fujisawa, T., Barraclough, T.G., 2013. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Syst. Biol.* 62, 707–724. doi:10.1093/sysbio/syt033
- Fujita, M.K., Leaché, A.D., Burbrink, F.T., McGuire, J.A., Moritz, C., 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 27, 480–488. doi:10.1016/j.tree.2012.04.012
- Gomes, L.C., Pessali, T.C., Sales, N.G., Pompeu, P.S., Carvalho, D.C., 2015. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica* 143, 581–588. doi:10.1007/s10709-015-9856-z
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* doi:citeulike-article-id:691774
- Hankison, S.J., Morris, M.R., 2003. Avoiding a compromise between sexual selection and species recognition: Female swordtail fish assess multiple species-specific cues. *Behav. Ecol.* 14, 282–287. doi:10.1093/beheco/14.2.282
- Hebert, P., Gregory, T.R., 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Syst. Biol.* 54, 852–859. doi:10.1080/10635150500354886
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218
- Heideman, N.J.L., Mulcahy, D.G., Sites, J.W., Hendricks, M.G.J., Daniels, S.R., 2011. Cryptic diversity and morphological convergence in threatened species of fossorial skinks in the genus *Scelotes* (Squamata: Scincidae) from the Western Cape Coast of South Africa: Implications for species boundaries, digit reduction and conservation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 61, 823–833. doi:10.1016/j.ympev.2011.08.021
- Henrique, P., Lucinda, F., Reis, R.E., 2005. P R O Systematics of the subfamily Poeciliinae Bonaparte (Cyprinodontiformes: Poeciliidae), with an emphasis on the tribe Cnesterodontini Hubbs. *Neotrop. Ichthyol.* 3, 1–60. doi:10.1590/S1679-62252005000100001

- Hrbek, T., Seckinger, J., Meyer, A., 2007. A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 43, 986–998. doi:10.1016/j.ympev.2006.06.009
- Hudson R.R. 2002. Generating samples under a Wright-Fisher neutral model of genetic variation. *Bioinformatics* 18:337–338.
- Parenti and Rauchenberger, 1989
- Huelsenbeck, J.P., 2001. Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. *Science* (80-. ). 294, 2310–2314. doi:10.1126/science.1065889
- Ingenito, L.F.D.S., Duboc, L.F., Abilhoa, V., 2004. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do Alto Rio Iguaçu, Paraná, Brasil. *Arq. cien. Vet. Zool. UNIPAR* 7, 23–36.
- Ingenito, L.F.S., Buckup, P.A., 2007. The Serra da Mantiqueira, south-eastern Brazil, as a biogeographical barrier for fishes. *J. Biogeogr.* 34, 1173–1182. doi:10.1111/j.1365-2699.2007.01686.x
- Iturralde-Vinent, M., MacPhee, R.D., 1999. Paleogeography of the Caribbean Region: Implications for Cenozoic Biogeography. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 238, 1–95. doi:10.2747/0020-6814.48.9.791
- Ivanova, N. V., Zemlak, T.S., Hanner, R.H., Hebert, P.D.N., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes* 7, 544–548. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x
- 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* btx025. doi:10.1093/bioinformatics/btx025
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1695–1701. doi:10.1093/molbev/mss020
- Langerhans, R.B., Layman, C.A., DeWitt, T.J., 2005. Male genital size reflects a tradeoff between attracting mates and avoiding predators in two live-bearing fish species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7618–7623. doi:10.1073/pnas.0500935102
- Lara, A., Ponce de León, J.L., Rodríguez, R., Casane, D., Côté, G., Bernatchez, L., García-Machado, E., 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: Evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 421–430. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02785.x
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452. doi:10.1093/bioinformatics/btp187
- Lucinda, P.H.F., 2008. Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the description of twenty-one new species. *Neotrop. Ichthyol.* 6, 113–158. doi:10.1590/S1679-62252008000200001
- Lucinda, P.H.F., 2003. Family Poeciliidae. *Check List Freshw. Fishes South Cent. Am.* 2, 555–581.
- Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M.C.S.L., Wesselingh, F., 1998. The stage for neotropical fish diversification a history of tropical south american rivers. *Phylogeny Classif. Neotrop. Fishes* 603.
- Maack, R. 1968. *Geografia física do Paraná*. Curitiba : Secretaria da Cultura e do Esporte. Ed. Jose Olimpo, 450
- Malabarba, M.C.S.L., 1998. Phylogeny of fossil Characiformes and paleobiogeography of the Tremembe Formation, Sao Paulo, Brazil. *Phylogeny Classif. Neotrop. Fishes* 69–84.
- Mazzoni, R., Novaes, V.C., Iglesias-Rios, R., 2011. Microhabitat use by *Phalloceros harpagos* Lucinda (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) from a coastal stream from Southeast Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 9, 665–672. doi:10.1590/S1679-

- 62252011005000027
- Miller, R.R., 1966. Geographic distribution of Central America freshwater fishes. *Copeia*, 773–802.
- Myers, G.S., 1966. Derivation of the Freshwater Fish Fauna of Central America. *Copeia* 1966, 766. doi:10.2307/1441405
- Near, T.J., Kassler, T.W., Koppelman, J.B., Dillman, C.B., Philipp, D.P., 2003. Speciation in North American Black Basses, *Micropterus* (Actinopterygii: Centrarchidae). *Evolution* (N. Y). 57, 1610. doi:10.1554/02-295
- Niemiller, M.L., Near, T.J., Fitzpatrick, B.M., 2012. Delimiting species using multilocus data: Diagnosing cryptic diversity in the southern cavefish, *typhlichthys subterraneus* (teleostei: Amblyopsidae). *Evolution* (N. Y). 66, 846–866. doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01480.x
- Oliveira, D. De, 2003. A captura do alto Rio Guaratuba : uma proposta metodológica para o estudo da evolução do relevo na Serra do Mar , Boracéia-SP 130.
- Parenti, L. R., Rauchenberger, M., 1989. Systematic overview of the poeciliines. Meffe, G.K., Snelson, F.F., Jr.Jr. (Eds.), *Ecology and Evolution of Livebearing Fishes (Poeciliidae)*. Prentice Hall, Jersey City, NJ, 3-12.
- Perdices, A., Bermingham, E., Montilla, A., Doadrio, I., 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 172–189. doi:10.1016/S1055-7903(02)00224-5
- Perdices, A., Doadrio, I., Bermingham, E., 2005. Evolutionary history of the synbranchid eels (Teleostei: Synbranchidae) in Central America and the Caribbean islands inferred from their molecular phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 460–473. doi:10.1016/j.ympev.2005.01.020
- Pereira, L.H.G., Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C., 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genet.* 14, 20. doi:10.1186/1471-2156-14-20
- Pereira, L.H.G., Maia, G.M.G., Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C., 2011. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA* 22, 71–79. doi:10.3109/19401736.2010.532213
- Petri, S., Fulvario, V. J., 1983. *Geologia do Brasil*. São Paulo, Edusp, 631
- Pons, J., Barraclough, T., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W., Vogler, A., 2006. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Syst. Biol.* 55, 595–609. doi:10.1080/10635150600852011
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G., 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 21, 1864–1877. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x
- R Development Core Team. 2010. R: a language and environment for statistical computing. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing.
- Raposo, M.I.B., 1995. Episódios intrusivos no Arco de Ponta Grossa, determinados através de um estudo paleomagnético. *Revista Brasileira de Geociências*, 3–19.
- Reznick, D.N., Furness, A.I., Meredith, R.W., Springer, M.S., 2017. The origin and biogeographic diversification of fishes in the family Poeciliidae. *PLoS One* 12, 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0172546
- Ribeiro, A.C., 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: An example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotrop. Ichthyol.* 4, 225–246. doi:10.1590/S1679-62252006000200009
- Ribeiro, A.C., Lima, F.C.T., Riccomini, C., Menezes, N.A., 2006. Fishes of the Atlantic

- Rainforest of Boracéia: Testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 17, 157–164. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Riccomini, C., 1989. O Rift Continental do Sudeste do Brasil. Ph.D. Thesis 319. doi:10.11606/T.44.1990.tde-18032013-105507
- Riccomini, C., Assumpção, M., 1999. Quaternary tectonics in Brazil. *Episodes* 22, 221–225. doi:citeulike-article-id:8858421
- Riccomini, C., Sant’Anna, L.G., Ferrari, A. L., 2004. Evolução geológica do rift continental do sudeste do Brasil. Pp. 383–405. In: Mantesso-Neto, V., A. Bartorelli, C. D. R. Carneiro & B. B. Brito-Neves (Eds.). *Geologia do continente Sul-Americano: Evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*. São Paulo, Editora Beca, 673
- Rosen, D.E., 1975. A vicariance model of caribbean biogeography. *Syst. Biol.* 24, 431–464. doi:10.1093/sysbio/24.4.431
- Rosenthal, A., Coutelle, O., Craxton, M., 1993. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res.* 21, 173–174.
- Rosso, J.J., Mabragaña, E., González Castro, M., Díaz de Astarloa, J.M., 2012. DNA barcoding Neotropical fishes: Recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 999–1011. doi:10.1111/1755-0998.12010
- Saadi, A., Machette, M.N., Haller, K.M., Dart, R.L., Bradley, L., Souza, A.M.P.D., 2002. Map and database of Quaternary faults and lineaments in Brazil. USGS Open-File Rep. 02–230, 59.
- Schultz, R.J., Miller, R.R., 1971. Species of the *Poecilia sphenops* Complex (Pisces: Poeciliidae) in Mexico. *Copeia* 1971, 282–290.
- Serra, J.P., Carvalho, F.R. De, Langeani, F., 2007. Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo State: composition and biogeography. *Biota Neotrop.* 7, 0–0. doi:10.1590/S1676-06032007000100011
- Silvestro, D., Michalak, I., 2012. RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Org. Divers. Evol.* 12, 335–337. doi:10.1007/s13127-011-0056-0
- Sivasundar, A., Bermingham, E., Ortí, G., 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.* 10, 407–417. doi:10.1046/j.1365-294X.2001.01194.x
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690. doi:10.1093/bioinformatics/btl446
- Takako, A.K., Oliveira, C., Oyakawa, O.T., 2005. Revision of the genus *Pseudotocinclus* (Siluriformes: Loricariidae: Hypoptopomatinae), with descriptions of two new species. *Neotrop. Ichthyol.* 3, 499–508. doi:10.1590/S1679-62252005000400007
- Takashi, H.S., Riccomini, C., Modenesi-Gauttieri, M.C. 2001. "Neotectônica no planalto de Campos do Jordão, SP. *Revista Brasileira de Geociências.* 375-384
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tang, C.Q., Humphreys, A.M., Fontaneto, D., Barraclough, T.G., 2014. Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data 1086–1094. doi:10.1111/2041-210X.12246
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S., Hebert,

- P.D.N., 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *J. Fish Biol.* 74, 377–402. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02077.x
- Vari, R.P., Malabarba, L.R., 1998. Neotropical Ichthyology: An Overview. *Phylogeny Classif. Neotrop. Fishes* 1870, 1–11.
- Yule, G.U., 1925. A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J. C. Willis, F.R.S. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 213, 402–410. doi:10.1098/rstb.1925.0002
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamatakis, A., 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements 29, 2869–2876. doi:10.1093/bioinformatics/btt499

## APÊNDICE A - Informações complementares sobre amostragem

Tabela A1. Informações sobre localização e suas respectivas correspondência aos haplótipos e filogrupos

| Haplótipos   | Filogrupo | Morfologia         | N  | Bacia                      | Fonte   | Latitude       | Longitude      | Registro do Museu | Informação adicional da Coleta              |
|--------------|-----------|--------------------|----|----------------------------|---------|----------------|----------------|-------------------|---|
| Hap_1 Hap_2  | RJ        | <i>P. harpagos</i> | 9  | Costeira do rio de Janeiro | NUP     | 22°10'52.00"S  | 41°23'40.99"W  | -                 | Afloramento associada à lagoa Catingosa     |
| Hap_2        | RJ        | <i>P. harpagos</i> | 10 | Rio Paraíba do Sul         | NUP     | 21°58'52.00"S  | 42°53'36.00"W  | -                 | Tributário do rio Paquequer                 |
| Hap_3 Hap_4  | ES        | <i>P. harpagos</i> | 4  | Rio Una                    | MBML    | 20°36'18.26"S  | 40°25'17.17"W  | MBML7466          | Rio Una (Parque Paulo Cesar Vinha)          |
| Hap_4        | ES        | <i>P. harpagos</i> | 2  | Rio Itapemirim             | MBML    | 20°36'13.51"S  | 41°12'12.72"W  | MBML8399          | Córrego Picada Comprida                     |
| Hap_4        | ES        | <i>P. harpagos</i> | 2  | Rio Jucu                   | MBML    | 20°22'24.29"S  | 40°50'59.61"W  | MBML8404          | Rio Jucu                                    |
| Hap_17       | SP        | <i>P. harpagos</i> | 1  | Costeira SP - SUDESTE      | MCT     | 23°46'26.96"S  | 45°43'42.88"W  | MCPT31130         | Arroio na praia de Juquehy - SP             |
| Hap_15       | SP        | <i>P. harpagos</i> | 1  | Costeira SP - SUDESTE      | MCT     | 23°49'11.999"S | 46°21'32.006"W | MCP31129          | Arroio na praia de Perequê - SP             |
| Hap_19       | SC        | <i>P. harpagos</i> | 1  | Costeira SC- SUDESTE       | MCT     | 26°19'35.997"S | 48°39'4.002"W  | MCP31124          | Rio Miranda, São Francisco do Sul - SC      |
| Hap_16       | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Costeira SP - SUDESTE      | MCT     | 23°43'13.000"S | 45°28'0.002"W  | MCP31352          | Aroio pequeno de Caraguatatuba - SP         |
| Hap_18       | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Rio Paraíba do Sul         | MCT     | 22°47'6.000"S  | 45°27'18.000"W | MCP42389          | Riacho afluente do Rio Ribeirão Grande      |
| Hap_9        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 2  | Alto rio Paraná            | GenBank | 22°26'56.04"S  | 45°20'47.04"W  | GU701580/81       | Rio Sapucaí-Mirim, Delfim Moreira           |
| Hap_9        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | GenBank | 22°40'33.24"S  | 45°40'58.44"W  | GU701585          | Rio Sapucaí-Mirim, Ribeirão Paiol Grande    |
| Hap_13       | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | NUP     | 22°11'52.27"S  | 54°57'33.68"W  | -                 | Rio dourado, Mato Grosso do Sul             |
| Hap_12       | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | GenBank | 15°34'54.12"S  | 47°30'23.04"W  | JN989119          | Rio Piripipau                               |
| Hap_10       | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | GenBank | 15°43'36.84"S  | 47°55'8.04"W   | JN989117          | Afluentes do Rio Paranoá                    |
| Hap_11       | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | GenBank | 15°44'12.84"S  | 47°54'54.36"W  | JN989120          | Afluentes do Rio Paranoá                    |
| Hap_11       | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | GenBank | 15°43'36.84"S  | 47°55'8.04"W   | JN989118          | Afluentes do Rio Paranoá                    |
| Hap_8        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 3  | Alto rio Paraná            | GenBank | 24° 4'24.60"S  | 52°17'27.96"W  | GU701582/83/86    | Rio Mourão                                  |
| Hap_7        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | NUP     | 24°35'53"S     | 51°15'26"W     | WJG2014011601     | Riacho sem nome - afluente do rio Lajeado   |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 3  | Alto rio Paraná            | NUP     | 24°47'09.0"S   | 51°53'19.3"W   | WJG 2015100203    | Riacho sem nome, afluente do rio Cantu      |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Costeira PR - SUDESTE      | MCT     | 25°25'20.000"S | 48°52'28.997"W | MCT31185          | Arrio afluente do rio Nhundiaquara, PR 411  |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | NUP     | 24°48'20.2"S   | 51°54'34.3"W   | WJG 2015100204    | Rio Barra Grande, afluente do rio Cantu     |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | NUP     | 24°56'03.4"S   | 50°07'29.0"W   | WJG2014101202     | Lajeado Carambeí, afluente do rio São João  |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 2  | Alto rio Paraná            | NUP     | 24°51'54.8"S   | 49°58'44.1"W   | WJG2014101203     | Arroio sem nome, afluente do rio Maracanã   |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | NUP     | 24°55'14.5"S   | 50°00'34"W     | WJG2014101102     | Rio Jotuba, afluente do rio Pitangui        |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 3  | Alto rio Paraná            | NUP     | 25°20'12"S     | 49°51'11.5"W   | WJG2014101001     | Rio Sobrado, afluente do rio Tibagi         |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | GenBank | 23°57'16.20"S  | 51° 6'50.76"W  | GU701579          | Afluente do rio Tibagi                      |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 3  | Alto rio Paraná            | NUP     | 25°26'53.3"S   | 50°17'55.9"W   | WJG2014100801     | Arroio Crispim, afluente do Guarauninha     |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | NUP     | 25°09'01"S     | 50°55'59"W     | WJG2014011802     | arroio sem nome - afluente do rio dos Patos |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | NUP     | 24°42'22.1"S   | 51°43'15.4"W   | WJG2014012701     | Rio Limeira, afluente do rio Borboleta      |
| Hap_5        | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 1  | Alto rio Paraná            | NUP     | 24°25'04.7"S   | 52°07'23.7"W   | WJG2014012801     | Rio Pinhalzinho, afluente do rio Muquillão  |
| Hap_14 Hap_5 | ALPR      | <i>P. harpagos</i> | 2  | Ribeira do Iguape          | MCT     | 24°50'13.000"S | 48°29'27.000"W | MCP30999          | Barra do turvo, rio Bonito                  |



|        |                 |                            |   |                   |         |               |                |               |  |
|--------|-----------------|----------------------------|---|-------------------|---------|---------------|----------------|---------------|--|
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 1 | Ribeira do Iguape | NUP     | 25°19'28.1"S  | 49°47'29.7"W   | WJG2014100904 | Rio Santa Cruz, afluente do rio Açungui      |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 2 | Ribeira do Iguape | NUP     | 25°15'17.8"S  | 49°47'09.4"W   | WJG2014101003 | Rio do Jacui, afluente do rio Santa Cruz     |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 1 | Ribeira do Iguape | NUP     | 25°16'38.9"S  | 49°33'38.6"W   | WJG2015100603 | Rio do Cerne, afluente do rio Açungui        |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 1 | Ribeira do Iguape | NUP     | 25°20'36.6"S  | 49°36'47.5"W   | WJG2015100702 | Rio Retiro, afluente do rio Açungui          |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 1 | Ribeira do Iguape | NUP     | 25°18'12.5"S  | 49°34'15.9"W   | WJG2015100703 | Riacho Boa Vista, afluente do rio Açungui    |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 2 | Ribeira do Iguape | NUP     | 25°18'03.5"S  | 49°28'03.2"W   | WJG2015100801 | Rio Conceição, afluente do Ribeira de Iguape |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 1 | Ribeira do Iguape | NUP     | 25°17'57.3"S  | 49°24'39.2"W   | WJG2015100802 | Rio da Barra, afluente do rio Conceição      |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 2 | Ribeira do Iguape | NUP     | 24°56'41.2"S  | 49°17'57.5"W   | WJG2015100804 | Ribeirão Estrela, afluente do Ponta Grossa   |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 1 | Rio Iguaçu        | NUP     | 25°54'17.9"S  | 51°35'46.9"W   | WJG2014100301 | Arroio Bonito, afluente do Rio Iguaçu        |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 1 | Rio Iguaçu        | NUP     | 25°55'02.5"S  | 51°35'56.2"W   | WJG2014100302 | Arroio da Reserva, afluente Rio Iguaçu       |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 1 | Rio Iguaçu        | NUP     | 25°54'45.9"S  | 51°34'49.6"W   | WJG2014100303 | Arroio sem nome, afluente do Rio da Areia    |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 3 | Rio Iguaçu        | NUP     | 25°26'32.6"S  | 51°25'44.4"W   | WJG2014100502 | Córrego Banana, afluente rio Jordão          |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 2 | Rio Iguaçu        | NUP     | 25°28'04.6"S  | 51°14'36.3"W   | WJG2015100401 | Riacho sem nome, afluente do rio Iratim      |
| Hap_5  | ALPR            | <i>P. harpagos</i>         | 1 | Rio Iguaçu        | NUP     | 25°31'58.69"S | 49°32'42.23"W  | -             | Rio Verde                                    |
| Hap 4  | ES              | <i>P. elachistos</i>       | 3 | Rio Doce          | MBML    | 19°47'21.37"S | 40°36'39.65"W  | MBML 6826     | Rio 25 de Julho                              |
| Hap 4  | ES              | <i>P. elachistos</i>       | 4 | Rio Doce          | MBML    | 19°49'33.01"S | 40°39'26.53"W  | MBML 6835     | Rio Santo Antonio                            |
| Hap_20 | <i>P. caudi</i> | <i>P. caudimaculatus</i>   | 1 | Rio Jacui         | MCT     | 29°5'33.998"S | 50°37'30.000"W | MCP22338      | Rio Lageado                                  |
| Hap_21 | <i>P. caudi</i> | <i>P. caudimaculatus</i>   | 1 | Rio Jacui         | MCT     | 29°15'25.27"S | 53°53'25.58"W  | MCP21251      | Município Segredo                            |
| Hap_6  | <i>P. uai</i>   | <i>P. uai</i>              | 2 | Rio São Francisco | GenBank | 19°28'04.8"S  | 43°52'04.8"W   | DCC01180/81   | Rio Jaboticatubas, Minas Gerais.             |
| Hap_6  | <i>P. uai</i>   | <i>P. uai</i>              | 5 | Rio São Francisco | GenBank | 19°51'36.0"S  | 43°44'49.2"W   | DCC31588 a 92 | Rio das Velhas, Sabara, Minas Gerais.        |
| Hap_6  | <i>P. uai</i>   | <i>P. uai</i>              | 1 | Rio São Francisco | GenBank | 19°27'39.6"S  | 43°43'12.0"W   | DCC31643      | Afluente Rio Cipo, Minas Gerais.             |
| Hap_22 | <b>Outgrup</b>  | <i>Poecilia reticulata</i> | 1 | x                 | GenBank | x             | x              | JX968696.1    | x  |

Obs. **N**: Número de indivíduos analisados; **Fonte**: Forma de obtenção dos espécimes. **NUP**: Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura; **MCP**: Museu de Ciências e Tecnologia – PUCRS; **MBML**: Museu de Biologia Professor Mello Leitão.

## APÊNDICE B. – Árvore de máxima verossimilhança

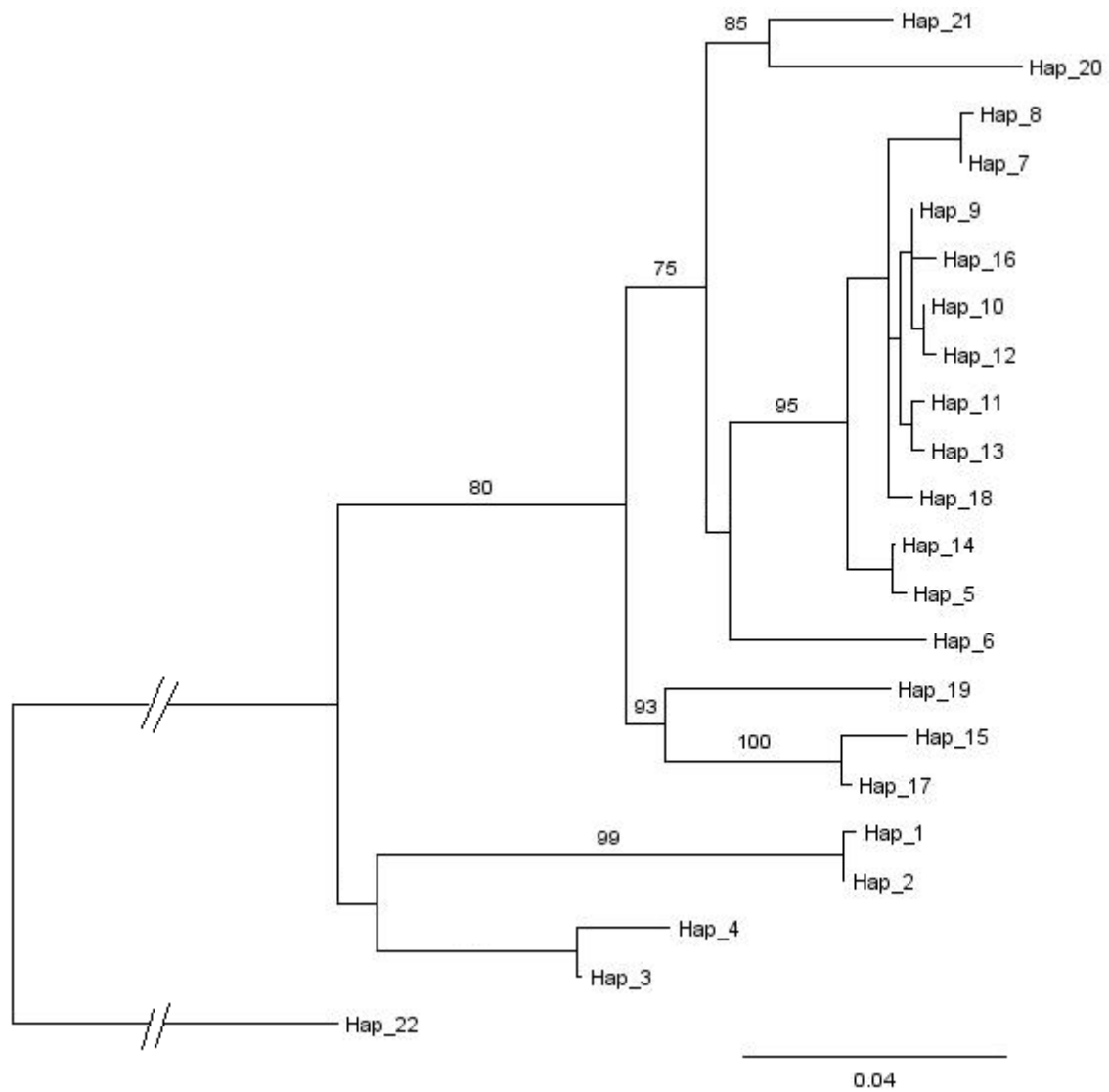


Figura B1. Árvore filogenética de máxima verossimilhança resultante de sequências parciais do gene COI de *Phalloceros*, com valores acima dos ramos indicando valores de *bootstrap*.

APÊNDICE C. – Árvore de inferência bayesiana

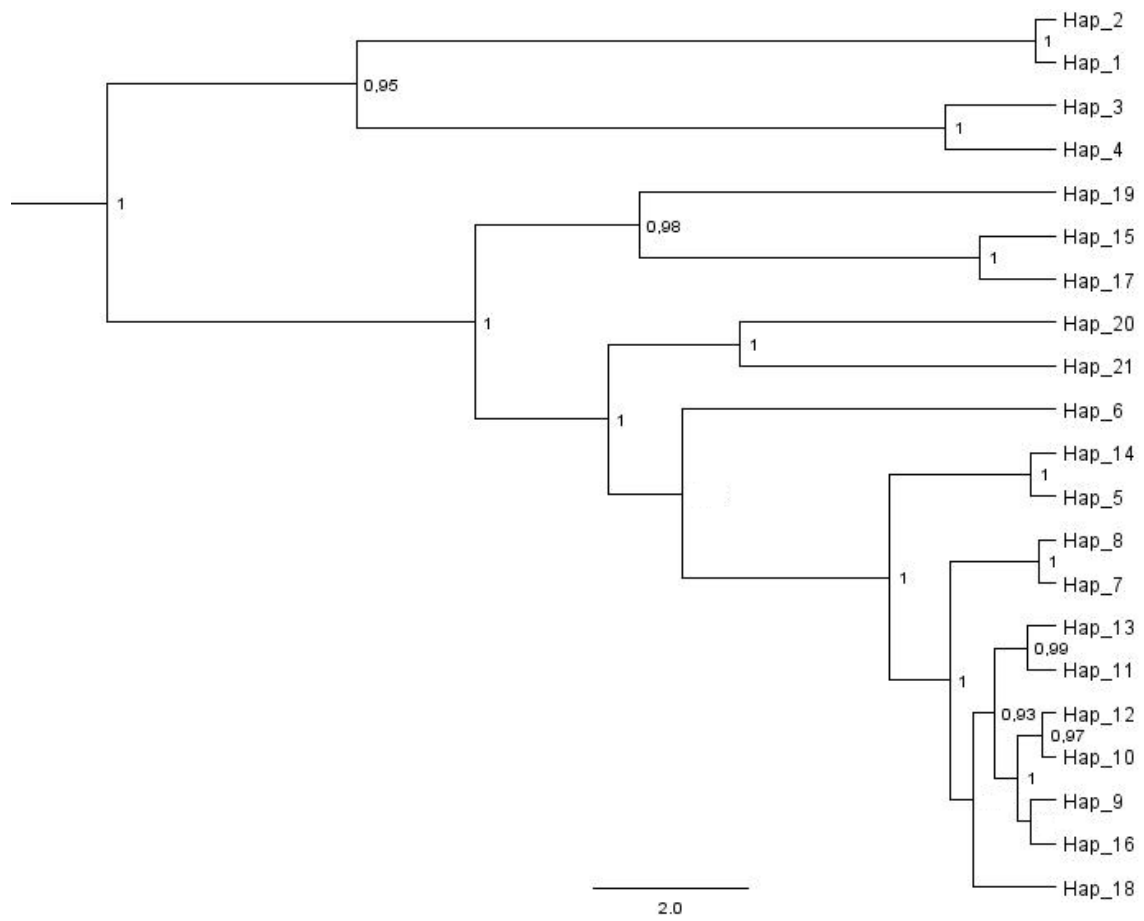


Figura C1. Árvore de inferência bayesiana calibrada com relógio molecular estrito resultante de seqüências parciais do gene COI de *Phalloceros*. Valores acima dos ramos indicam a probabilidade *a posteriori*;

## APÊNDICE D – Resultados do ABGD

**Número de grupos encontrados:** 9 grupos (p= 0.0010)

**Grupo [ 1 ] n: 2 ;** Hap\_1 Hap\_2

**Grupo [ 2 ] n: 2 ;** Hap\_3 Hap\_4

**Grupo [ 3 ] n: 11 ;** Hap\_5 Hap\_7 Hap\_8 Hap\_9 Hap\_10 Hap\_11 Hap\_12 Hap\_13  
Hap\_14 Hap\_16 Hap\_18

**Grupo [ 4 ] n: 1 ;** Hap\_6

**Grupo [ 5 ] n: 2 ;** Hap\_15 Hap\_17

**Grupo [ 6 ] n: 1 ;** Hap\_19

**Grupo [ 7 ] n: 1 ;** Hap\_20

**Grupo [ 8 ] n: 1 ;** Hap\_21

**Grupo [ 9 ] n: 1 ;** Hap\_22

**Matriz de distância:** (((Hap\_12 \_group 3 :0.002456,Hap\_10 \_group 3 :0.001154)  
:0.001550,Hap\_9 \_group 3 :0.001067) :0.000339,Hap\_16 \_group 3  
:0.004113,(((((((Hap\_22 \_group 9 :0.135160,(Hap\_4 \_group 2 :0.009928,Hap\_3  
\_group 2 :0.006318) :0.027194) :0.001631,(Hap\_2 \_group 1 :0.002031,Hap\_1  
\_group 1 :0.001579) :0.046855) :0.022483,(Hap\_19 \_group 6 :0.026655,(Hap\_17  
\_group 5 :0.004262,Hap\_15 \_group 5 :0.008373) :0.021847) :0.010903)  
:0.003507,(Hap\_21 \_group 8 :0.018996,Hap\_20 \_group 7 :0.031545) :0.007041)  
:0.001167,Hap\_6 \_group 4 :0.026445) :0.014395,(Hap\_14 \_group 3  
:0.000903,Hap\_5 \_group 3 :0.002708) :0.006601) :0.003763,(Hap\_8 \_group 3  
:0.002700,Hap\_7 \_group 3 :0.000910) :0.009604) :0.001728,Hap\_18 \_group 3  
:0.004473) :0.001447,(Hap\_13 \_group 3 :0.003008,Hap\_11 \_group 3 :0.002407)  
:0.002186) :0.001193);

## APÊNDICE E - Árvore de delimitação do PTP

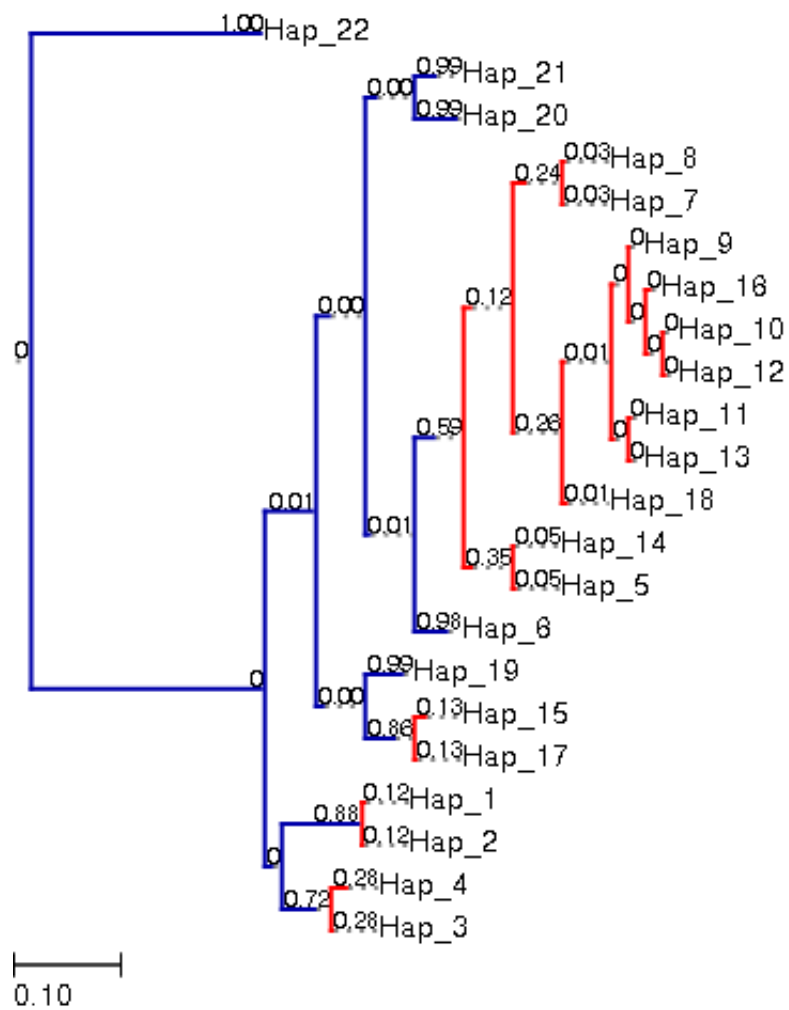


Figura E.1. Árvore de delimitação de espécies de *Phalloceros* pelo PTP. Cor azul representa OTU distintas, enquanto que a cor vermelha representa a mesma OTU.

## APÊNDICE F - Árvore de delimitação do GMYC

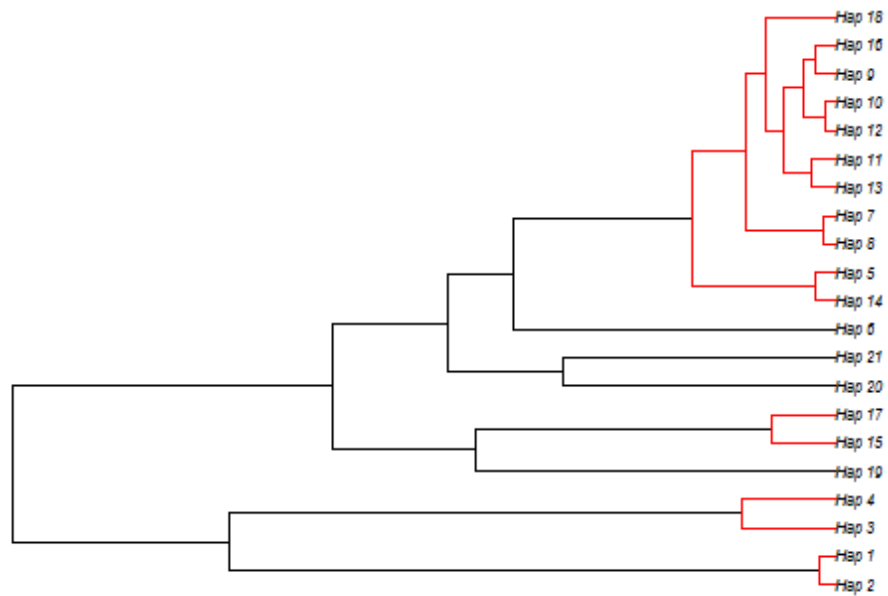


Figura F.1. Árvore de delimitação de espécie de *Phalloceros* pelo GMYC. Cor preta representa OTU distintas, enquanto que a cor vermelha representa a mesma OTU.

## APÊNDICE G - Distância genética entre haplótipos

Tabela G.1- Distância genética entre os haplótipos

|               | Hap_1 | Hap_2 | Hap_3 | Hap_4 | Hap_5 | Hap_6 | Hap_7 | Hap_8 | Hap_9 | Hap_10 | Hap_11 | Hap_12 | Hap_13 | Hap_14 | Hap_15 | Hap_16 | Hap_17 | Hap_18 | Hap_19 | Hap_20 | Hap_21 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>Hap_1</b>  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_2</b>  | 0.002 |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_3</b>  | 0.086 | 0.084 |       |       |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_4</b>  | 0.098 | 0.096 | 0.015 |       |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_5</b>  | 0.106 | 0.109 | 0.093 | 0.097 |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_6</b>  | 0.106 | 0.109 | 0.091 | 0.100 | 0.051 |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_7</b>  | 0.102 | 0.100 | 0.095 | 0.099 | 0.022 | 0.059 |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_8</b>  | 0.104 | 0.102 | 0.097 | 0.102 | 0.024 | 0.061 | 0.002 |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_9</b>  | 0.107 | 0.109 | 0.093 | 0.093 | 0.018 | 0.051 | 0.015 | 0.016 |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_10</b> | 0.104 | 0.107 | 0.091 | 0.091 | 0.016 | 0.053 | 0.016 | 0.018 | 0.002 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_11</b> | 0.113 | 0.115 | 0.097 | 0.097 | 0.02  | 0.049 | 0.017 | 0.018 | 0.005 | 0.007  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_12</b> | 0.107 | 0.109 | 0.093 | 0.093 | 0.018 | 0.055 | 0.018 | 0.02  | 0.004 | 0.002  | 0.005  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_13</b> | 0.113 | 0.115 | 0.097 | 0.097 | 0.02  | 0.049 | 0.017 | 0.018 | 0.005 | 0.007  | 0.004  | 0.009  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_14</b> | 0.104 | 0.106 | 0.091 | 0.095 | 0.002 | 0.049 | 0.02  | 0.022 | 0.016 | 0.015  | 0.018  | 0.016  | 0.018  |        |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_15</b> | 0.139 | 0.137 | 0.105 | 0.114 | 0.077 | 0.075 | 0.077 | 0.075 | 0.073 | 0.071  | 0.075  | 0.073  | 0.075  | 0.075  |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_16</b> | 0.107 | 0.109 | 0.093 | 0.093 | 0.022 | 0.055 | 0.018 | 0.02  | 0.004 | 0.005  | 0.009  | 0.007  | 0.009  | 0.02   | 0.077  |        |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_17</b> | 0.13  | 0.128 | 0.096 | 0.105 | 0.067 | 0.065 | 0.075 | 0.077 | 0.071 | 0.069  | 0.073  | 0.071  | 0.073  | 0.065  | 0.011  | 0.075  |        |        |        |        |        |
| <b>Hap_18</b> | 0.107 | 0.109 | 0.091 | 0.095 | 0.018 | 0.051 | 0.015 | 0.017 | 0.007 | 0.009  | 0.009  | 0.011  | 0.009  | 0.016  | 0.069  | 0.007  | 0.067  |        |        |        |        |
| <b>Hap_19</b> | 0.125 | 0.123 | 0.098 | 0.107 | 0.067 | 0.071 | 0.069 | 0.071 | 0.071 | 0.069  | 0.073  | 0.071  | 0.073  | 0.065  | 0.055  | 0.075  | 0.055  | 0.071  |        |        |        |
| <b>Hap_20</b> | 0.13  | 0.133 | 0.11  | 0.119 | 0.063 | 0.075 | 0.071 | 0.073 | 0.067 | 0.065  | 0.069  | 0.067  | 0.069  | 0.061  | 0.079  | 0.071  | 0.073  | 0.067  | 0.077  |        |        |
| <b>Hap_21</b> | 0.113 | 0.115 | 0.093 | 0.101 | 0.051 | 0.053 | 0.059 | 0.061 | 0.051 | 0.053  | 0.053  | 0.055  | 0.053  | 0.049  | 0.075  | 0.055  | 0.065  | 0.051  | 0.073  | 0.051  |        |
| <b>Hap_22</b> | 0.219 | 0.219 | 0.195 | 0.191 | 0.218 | 0.226 | 0.228 | 0.231 | 0.228 | 0.225  | 0.223  | 0.223  | 0.223  | 0.215  | 0.223  | 0.225  | 0.215  | 0.228  | 0.208  | 0.233  | 0.22   |

